



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

INFEÇÃO POR AGENTES DE DOENÇAS CANINAS TRANSMITIDOS POR VETORES EM
CÃES DE CAÇA NO CONCELHO DE LOURES

MARIA DIAS ALBERTO MARQUEZ DUARTE

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Doutor José Augusto Farraia e Silva Meireles

Dra. Andreia Sofia Dórdio Peralta Severino

ORIENTADOR

Dra. Andreia Sofia Dórdio

Peralta Severino

COORDINADOR

Doutora Isabel Maria Soares

Pereira da Fonseca

2016

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

INFEÇÃO POR AGENTES DE DOENÇAS CANINAS TRANSMITIDOS POR VETORES EM
CÃES DE CAÇA NO CONCELHO DE LOURES

MARIA DIAS ALBERTO MARQUEZ DUARTE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Doutor José Augusto Farraia e Silva Meireles

Dra. Andreia Sofia Dórdio Peralta Severino

ORIENTADOR

Dra. Andreia Sofia Dórdio

Peralta Severino

COORIENTADOR

Doutora Isabel Maria Soares

Pereira da Fonseca

2016

LISBOA

Dedico este trabalho a todas as pessoas que se cruzaram comigo,
por terem contribuído para a pessoa que sou hoje.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Andreia Severino, pela transmissão de conhecimentos e possibilidade de tomar contato direto com a profissão do Médico Veterinário em clínica de pequenos animais.

À minha coorientadora Professora Doutora Isabel Pereira da Fonseca, pela disponibilidade, pela vontade de transmitir conhecimentos e partilhar experiências, foi sem dúvida uma força essencial para a realização desta dissertação.

À Dra. Lídia Gomes, pelas horas dedicadas e paciência na execução das técnicas laboratoriais com a sua contagiante e boa disposição.

À Professora Doutora Isabel Neto pela atenção e disponibilidade na execução da análise estatística.

Aos meus pais, pela minha existência, pela minha educação, pela minha paixão pelos animais, por aquilo que sou hoje.

À minha família, por me apoiar na realização deste sonho e por entender esta minha paixão pelos animais.

Ao meu irmão, pelas diferenças que nos unem, dando equilíbrio à minha vida, ao pensar no reverso da medalha.

Aos meus amigos, que foram uma constante, um privilégio e uma parte importante desta jornada, obrigada por serem assim e estarem presentes, sem reservas.

Aos bons e aos maus momentos, às boas e más experiências, aos altos e baixos, às boas e más decisões, ainda bem que existiram, ainda bem que me fizeram crescer. Assim cheguei aqui, a lutar e a trabalhar, com falhanços e vitórias, com dúvidas, com ideias, com esperança... mas acima de tudo com força para conseguir atingir um objetivo e um sonho, ser eu mesma naquilo que mais gosto de fazer, trabalhar com animais e ter a oportunidade de os tratar.

À minha mãe, por ser a minha mãe, porque me apoiou assim, por ser como é comigo e eu com ela. É a minha força oculta, para o melhor e o pior, na incondicional forma de estar comigo. Sem ti, isto não teria sido possível.

Deixo um agradecimento especial a quem não pode entender estas palavras, os meus animais, por estarem presentes na minha vida e darem sentido a esta jornada, por me darem um amor absoluto nos dias mais cinzentos. A eles, devo a minha paixão de ser Médica Veterinária.

RESUMO

Infeção por Agentes de Doenças Caninas Transmitidos por Vetores em Cães de Caça no Concelho de Loures.

As CVBD (Canine Vector Borne Diseases) ou Doenças Caninas Transmitidas por Vetores (DCTV) são provocadas por agentes patogénicos veiculados por artrópodes hematófagos. Além da sua importância em Medicina Veterinária na origem de doenças parasitárias, alguns destes agentes possuem potencial zoonótico com impacto na Saúde Pública. O cão doméstico (*Canis familiaris*) assume, em alguns casos, o papel de sentinela na exposição aos agentes de DCTV pois é um hospedeiro competente para estes parasitas, aumentando o risco de infeção do Homem.

Os cães de caça em particular estão frequentemente expostos a diferentes ectoparasitas capazes de transmitir agentes patogénicos, desenvolvendo amiude infeções agudas, subclínicas ou crónicas. A evidência de infeção recente ou antiga por determinados agentes nesta população, contribui para o melhor conhecimento da sua seroprevalência em determinadas áreas geográficas. O contato destes cães, com espécies silvestres e com outros cães, representa uma forma de manutenção de agentes de DCTV no ciclo silvestre e doméstico, sendo o último mais perigoso devido ao contato estreito entre o Homem e os seus cães de caça. A movimentação dos cães de caça promove a deslocação de agentes de DCTV para zonas não endémicas.

O estudo realizado nesta dissertação teve como objetivo o rastreio de infeção por diferentes agentes de DCTV em 60 cães de caça, sem sinais clínicos, no concelho de Loures, Área Metropolitana de Lisboa, Portugal. As técnicas de diagnóstico utilizadas foram esfregaços sanguíneos, técnica de Knott modificada, imunocromatografia, imunofluorescência indireta (IFI) e ensaio imunoenzimático (ELISA). Através de informações recolhidas junto dos proprietários foi possível organizar dados sobre o meio ambiente, as características físicas e as medidas profiláticas aplicadas em cada cão. Entre os cães estudados, 95% (57/60) apresentaram evidência de infeção por pelo menos um agente de DCTV. As prevalências para cada infeção, obtidas pelas diferentes técnicas, foram: 20% (12/60) para *Anaplasma phagocytophilum*; 23,3% (14/60) para *Babesia* spp.; 40% (24/60) para *Ehrlichia canis*; 3,3% (2/60) para *Hepatozoon canis*; 3,3% (2/60) para *Leishmania infantum*; 20% (12/60) para microfírias das quais 0,08% (1/12) eram *Dirofilaria immitis*; 16,6% (10/60) para *Mycoplasma* spp. e 90% (54/60) para *Rickettsia conorii*. Na análise estatística não se observou nenhuma associação significativa entre as informações recolhidas sobre cada cão e os resultados das técnicas de diagnóstico utilizadas. As elevadas prevalências das infeções por agentes de doenças caninas transmitidos por ixodídeos alertam para o elevado risco de exposição do Homem a estes agentes, no concelho de Loures. Os resultados apontam para a necessidade de sensibilizar e alertar os proprietários de cães de caça para uma maior aposta na proteção individual dos seus animais contra os vetores artrópodes. A contribuição do Médico Veterinário é fundamental para informar o proprietário e auxiliar na escolha dos métodos de proteção mais adequados para cada situação.

Palavras-chave: cães de caça, DCTV, Loures, Portugal, rastreio.

ABSTRACT

Infection by Canine Vector Borne Diseases pathogens in Hunting Dogs from Loures County.

Canine Vector Borne Diseases (CVBD) are caused by a wide range of pathogens transmitted by hematophagous arthropods. In addition to their veterinary importance in parasitic illness, some CVBD pathogens have zoonotic potential. As the domestic dog (*Canis familiaris*) is a competent host for some of these parasites, increasing human risk of infection, it can be used as sentinel to identify the presence of CVBD exposure.

Hunting dogs, in particular, are frequently exposed to different ectoparasites capable of transmitting pathogens acquiring often acute, sub clinic or chronic infections. Evidence of past or recent infection by certain CVBD in this dog population contributes for a better understanding of its seroprevalence in specific geographical areas. The contact of hunting dogs, both with wild species or other dogs represents a path for the maintenance of CVBD pathogens in wild and domestic cycle, being the last one the most important due to the close relationship between humans and their hunting dogs. In the same way, the mobility of hunting dogs also promotes the increased distribution of CVBD pathogens to non endemic areas.

This study was designed to determine the prevalence of infection, for different CVBD pathogens, in 60 asymptomatic hunting dogs living in Loures, County of Lisbon Metropolitan Area, Portugal. Blood smears, modified Knott test, immunochromatography, indirect immunofluoresce antibody test (IFAT) and enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) were used for parasites and antibodies screening. After collection of information with the owners, data about the environment, physical characteristics and prophylactic measures applied to each dog was organized. Among 60 dogs examined, 95% (57/60) were infected at least with one CVBD agent. Overall positivity rates obtained by different diagnostic techniques were: 20% (12/60) for *Anaplasma phagocytophilum*; 23,3% (14/60) for *Babesia* spp.; 40% (24/60) for *Ehrlichia canis*; 3,3% (2/60) for *Hepatozoon canis*; 3,3% (2/60) for *Leishmania infantum*; 20% (12/60) for microfilariae, with 0,08% (1/12) were *Dirofilaria immitis*; 16,6% (10/60) for *Mycoplasma* spp. and 90% (54/60) for *Rickettsia conorii*.

No association was detected between data reported by the owners and laboratorial test results. However, seropositivity rates for canine tick borne infections alert for the risk of high exposure of humans to different pathogens transmitted by ticks in Loures County.

The obtained results highlight the need to create awareness among the owners of hunting dogs to increase the individual protection against arthropod vectors. In this matter, Veterinarians' contribute is essential to inform hunting dog owners and to lead the choice of the most suitable products for each situation.

Keywords: hunting dogs, CVBD, Loures, Portugal, screening.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO	ii
ABSTRACT.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE GRÁFICOS	vi
ÍNDICE DE TABELAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
Capítulo I – Atividades desenvolvidas durante o estágio.....	1
Capítulo II – Introdução	4
Capítulo III – Revisão bibliográfica.....	6
1. Agentes Etiológicos de Doenças Caninas Transmitidos por Ixodídeos	6
1.1 <i>Anaplasma</i> spp.	6
1.2 <i>Babesia</i> spp.	8
1.3 <i>Ehrlichia canis</i>	12
1.4 <i>Hepatozoon canis</i>	15
1.5 <i>Mycoplasma</i> spp.....	17
1.6 <i>Rickettsia conorii</i>	19
2. Agentes Etiológicos de Doenças Caninas Transmitidos por Culicídeos	21
2.1 <i>Acanthocheilonema reconditum</i>	21
2.2 <i>Dirofilaria immitis</i>	21
3. Agentes Etiológicos de Doenças Caninas Transmitidos por Flebótomos	26
3.1 <i>Leishmania infantum</i>	26
4. Profilaxia de doenças caninas transmitidas por vetores	31
Capítulo IV – Infecção por Agentes de Doenças Caninas Transmitidos por Vetores em cães de caça no concelho de Loures	34
1. OBJETIVOS	34
2. MATERIAL E MÉTODOS	34
2.1 Caracterização da amostra.....	34
2.2 Colheita de amostras e processamento.....	34
2.3 Esfregaços sanguíneos	35
2.4 Pesquisa de microfilárias pela Técnica de Knott modificada (Bowman, 2003).....	35
2.5 Detecção de antígeno solúvel de <i>D. immitis</i> por imunocromatografia	35
2.6 Pesquisa de anticorpos por Imunofluorescência Indireta	36
2.7 Pesquisa de anticorpos por ELISA.....	36
2.8 Análise estatística.....	37
3. RESULTADOS	37

3.1	Caracterização da amostra.....	37
3.2	Resultados da informação recolhida juntos dos proprietários.....	38
3.3	Deteção de parasitas em esfregaço sanguíneo.....	39
3.4	Deteção de microfilárias pela técnica de Knott modificada.....	40
3.5	Deteção de antigénio de <i>Dirofilaria immitis</i> através de imunocromatografia.....	40
3.6	Deteção de anticorpos através de IFI	41
3.7	Deteção de anticorpos anti- <i>Babesia</i> spp. através de ELISA	42
3.8	Seroprevalências.....	43
3.9	Infeções e coinfeções observadas.....	43
4.	DISCUSSÃO.....	46
4.1	Caracterização da amostra.....	46
4.2	Deteção de hemoparasitas em esfregaços sanguíneos.....	48
4.2.1	Deteção de <i>Hepatozoon canis</i>	48
4.2.2	Deteção de <i>Mycoplasma</i> spp.	49
4.3	Deteção de anticorpos pela técnica de IFI.....	50
4.3.1	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	51
4.3.2	<i>Ehrlichia canis</i>	52
4.3.3	<i>Leishmania infantum</i>	53
4.3.4	<i>Rickettsia conorii</i>	59
4.4	Deteção de anticorpos pela técnica ELISA	61
4.4.1	<i>Babesia</i> spp.	61
4.5	Deteção de microfilárias pela Técnica de Knott modificada e deteção de Ag de <i>D. immitis</i>	64
5.	COINFEÇÕES	67
6.	CONCLUSÃO	72
	BIBLIOGRAFIA.....	73
	ANEXOS.....	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Cadela com petéquias na periferia do pavilhão auricular (à esquerda) e petéquias na zona abdominal (à direita). (Originais).....	2
Figura 2: Cão com Leishmaniose Canina, antes e depois do tratamento (originais).....	3
Figura 3: Cadela cruzada de Beagle com Leishmaniose Canina. Antes e após o tratamento (originais).....	3
Figura 4: <i>Hepatozoon canis</i> em neutrófilos. A- amostra nº38. B- amostra nº58. (Originais).	39
Figura 5: Microfilárias em esfregaço sanguíneo da amostra nº12, com resultado positivo à pesquisa de Ag de <i>D. immitis</i> por imunocromatografia, (originais).....	40
Figura 6: Microfilárias detetadas pela técnica de Knott modificada. A- amostra nº8. B -amostra nº55. (Originais).	40
Figura 7: A- KIT WITNESS®Dirofilaria antes da realização do teste. B-Resultado positivo, a cabeça da seta indica ausência de banda no teste. A seta inteira indica uma banda cor de rosa, significando resultado positivo para a presença de Ag de <i>D. immitis</i> no soro. Ambos os testes apresentam uma banda cor de rosa escura à direita na janela de observação dos resultados. Esta banda representa o controlo do teste, validando-o.	41
Figura 8: Detecção de anticorpos anti- <i>Ehrlichia canis</i> por IFI. A- resultado negativo. B- resultado positivo. (Originais).	41
Figura 9: Detecção de anticorpos anti- <i>Rickettsia conorii</i> por IFI. A- resultado negativo. B- resultado positivo. (Originais).	41
Figura 10: Detecção de anticorpos anti- <i>Anaplasma phagocytophilum</i> por IFI. A- resultado negativo. B- resultado positivo. (Originais).....	42
Figura 11: Detecção de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> spp. por IFI. Resultado positivo, (original).	42
Figura 12: Resultado final da técnica ELISA após adição da solução de paragem. É possível observar os diferentes tons de laranja e amarelo, assim como alguns pocilhos incolores, diferenças que se manifestam na leitura óptica em espectrofotómetro, (original).....	42
Figura 13: Cadela de caça de raça cruzada de Beagle incluída no presente estudo (original).	44

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Procedimentos assistidos durante o estágio.	2
Gráfico 2: caracterização dos cães estudados de acordo com o sexo e a idade (n=60):.....	37
Gráfico 3: a frequência absoluta de cada raça (n=60).	37
Gráfico 4: Prevalência dos tipos de pelagem presentes nos cães em estudo.	37
Gráfico 5: Prevalência e número de animais em meio urbano e suburbano.	38
Gráfico 6: Número e prevalência das medidas profiláticas e ectoparasiticidas aplicadas.....	39
Gráfico 7: Frequência absoluta e relativa das infeções detetadas por técnicas serológicas, n=60.	43
Gráfico 8: Distribuição das infeções por um ou mais agentes pelas idades dos cães em estudo.	43
Gráfico 9: Número de agentes de DCTV por tipo de pelagem (n=57)*.	44
Gráfico 10: Distribuição do número de infeções pelo tipo de meio envolvente:	44

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Testes de IFI utilizados, fabricantes respectivos e limiares de positividade.	36
Tabela 2: Resumo do número de agentes de DCTV detetados nos animais em estudo.	44

LISTA DE ABREVIATURAS

< : inferior

> : superior

μ: micrómetro

ADN: ácidodesoxirribonucleico

Ac: anticorpos

Ag: antigénio

AGH: anaplasmoze granulocítica humana

BC: babesioze canina

CAMV: centro de atendimento médico veterinário

DC: dirofilarioze canina

DCTI: doenças caninas transmitidas por ixodídeos

DCTV: doenças caninas transmitidas por vetores

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*)

ELISA: ensaio imunoenzimático (do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*)

EMC: erliquioze monocítica canina

EUA: Estados Unidos da América

FBC: febre botonosa canina

FEN: febre escaro-nodular

WHO: Organização Mundial de Saúde (do inglês *world health organization* FM: febre mediterrânica

FMV-UL: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa

HC: hemoplasmoze canina

HC: hepatozoonoze canina

HIV: vírus da imunodeficiência humana (do inglês *Human immunodeficiency vírus*)

IFI: imunofluorescência indireta

ml: mililitro

nº: número de animais

LCan: leishmanioze canina

LVH: leishmanioze visceral humana

nm: nanómetros

P: valor de qui-quadrado

PBS: tampão fosfato salino (do inglês *Phosphate buffered saline*)

PCR: reação em cadeia da polimerase (do inglês *polymerase chain reaction*)

qPCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real (do inglês *quantitative real time polymerase chain reaction*)

rpm: rotações por minuto

SNC: sistema nervoso central

spp.: espécies

UL: Universidade de Lisboa

Capítulo I – Atividades desenvolvidas durante o estágio

O estágio curricular decorreu no Centro de Atendimento Médico Veterinário “Tojalvet” em Santo Antão do Tojal, no concelho Loures, sob a orientação da Dra. Andreia Severino, e teve a duração 2500 horas. Este consultório dedica-se maioritariamente à clínica de pequenos animais, realizando ocasionalmente consultas ao domicílio a equinos.

O tipo de animais presente às consultas era variado: animais de companhia que viviam em apartamento, cães de grande porte para guarda de moradias e armazéns, cães e gatos de criadores de diversas raças, cães e gatos de companhia que permanecem em quintais ou hortas, cães de canil e cães de caça, sendo este último grupo o alvo da presente dissertação. Também foi possível prestar assistência a alguns animais provenientes de associações por vários motivos: doenças infecciosas, esterilização, mudança de pensos, desparasitação, identificação eletrónica e vacinação.

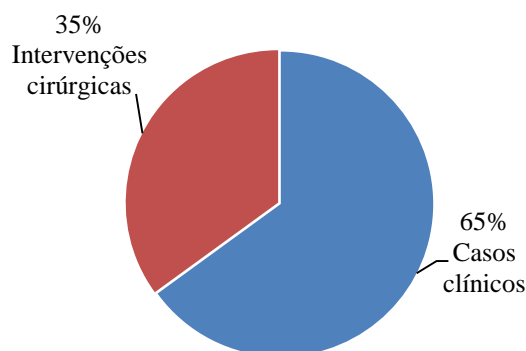
Pelas características inerentes à profissão de um Médico Veterinário, a Dra. Andreia Severino deslocava-se com frequência para fazer consultas ao domicílio, atividade na qual a autora teve a oportunidade de participar e dar apoio, no sentido de vivenciar as dinâmicas inerentes à profissão no decorrer das consultas ao domicílio.

Surgiu a oportunidade de constatar o impacto económico dos últimos anos na gestão da saúde dos animais de companhia. As condicionantes financeiras de alguns proprietários conduzem ao adiamento da visita ao Médico Veterinário. Este acontecimento promove a deterioração da saúde de alguns animais de companhia quando alguma afeção carece de cuidados imediatos e diagnóstico precoce. Por outro lado, notou-se uma crescente preocupação na correta primovacinação e colocação de identificação eletrónica nos cachorros e cumprimento do protocolo vacinal no intuito de manter um estado geral de saúde ótimo e diminuir a probabilidade de surgir doença. Observou-se o aumento da aplicação de medidas preventivas no combate aos ectoparasitas afim de evitar doenças caninas transmitidas por vetores (DCTV) e o interesse na qualidade da alimentação dos animais na medida em que se reflete também na saúde. Felizmente a escolha de muitos donos em esterilizar os seus animais tem igualmente aumentado, com a intenção de controlar ninhadas indesejadas e prevenir doenças relacionadas com infeções uterinas, tumores mamários e testiculares. Ao longo do estágio foi enfatizada a importância do Médico Veterinário na informação ao dono, referente a perigos potenciais para o seu animal de companhia, boas práticas na higiene, alimentação e educação de cada espécie, assim como aconselhamento, inclusive do tipo de raça mais adequada para cada estilo de vida.

Devido à estrutura física do CAMV “Tojalvet”, com salas de consulta e cirurgia, jaulas de internamento para recobro pós-operatório e equipamento para realizar radiografia, ecografia e algumas análises clínicas hematológicas, foi possível observar e participar em várias cirurgias, de carácter urgente ou por conveniência. A autora estimou que cerca de 30% dos animais que deram entrada no CAMV foram sujeitos a algum tipo de intervenção cirúrgica (gráfico 1), destacando-se as ovariectomias, orquiectomias, mastectomias, cesarianas, enterotomias, destartarizações,

resolução de hérnias inguinais, amputação de dígitos ou membros, suturas de lacerações, remoção de corpos estranhos, laparotomias exploratórias e correção de defeitos congênitos, como por exemplo a correção de entrópeon.

Gráfico 1: Procedimentos assistidos durante o estágio.



Nas consultas foi possível acompanhar acções de vacinação, desparasitação e assistir a casos clínicos como por exemplo: reacções alérgicas, problemas dermatológicos, envenenamentos, doenças infecciosas, afeções gastro-intestinais, respiratórias e cardíacas, neoplasias, traumatismos, etc.

A casuística foi a mais variada, tendo-se destacado a grande quantidade de animais com quadro clínico compatível com DCTV.

Os cães de caça, devido ao tipo de atividade desenvolvida em meios rurais, foram atendidos com frequência na presença de quadros clínicos agudos de prostração, pirexia, anorexia, mucosas pálidas ou ictéricas, petéquias e/ou equimoses, claudicação, azotémia e por vezes convulsões (Figura 1).



Figura 1: Cadela com petéquias na periferia do pavilhão auricular (à esquerda) e petéquias na zona abdominal (à direita). (Originais).

Durante o estágio surgiu a necessidade de compreender melhor a epidemiologia, etiologia, fisiopatologia, tratamento e os métodos de diagnóstico mais adequados na presença de quadros clínicos suspeitos provocados por agentes de DCTV (Figuras 2 e 3).

Com base no interesse no tema, a autora optou pela pesquisa de infecção por diferentes agentes de DCTV em cães de caça assintomáticos, incluindo agentes zoonóticos de interesse para a Saúde Pública.



Figura 2: Cão com Leishmaniose Canina, antes e depois do tratamento. (Originais).



Figura 3: Cadela cruzada de Beagle com Leishmaniose Canina. Antes e após o tratamento. (Originais).

Capítulo II – Introdução

A emergência e reemergência de doenças infecciosas e parasitárias observa-se devido à complacência política e sócio cultural. A diminuição do controlo na movimentação de animais entre fronteiras na Europa e a não aplicação da quarentena observada em alguns países, nomeadamente no Reino Unido, permitiu a disseminação e instalação de DCTV em zonas consideradas não endémicas. O mesmo se tem constatado no norte da Europa, onde se identificam vetores e agentes de DCTV em zonas onde anteriormente estes não eram detetados (Bourdeau *et al.*, 2014; Chomel, 2011; Pennisi, 2015; Shaw & Day, 2005). Estas são consequências das deslocações de animais de companhia (mudança de casa, viagens, concursos desportivos, realojamento de animais adotados) entre países e continentes, a urbanização de zonas sitas em ambiente rural e o aumento da densidade populacional com o respetivo aumento da detenção de animais de companhia. Note-se também que o impacto da recente crise socioeconómica resultou numa redução dos cuidados profiláticos contra vetores, de acordo com Madeira de Carvalho *et al.* (2013) citado por Alho *et al.* (2014).

Portugal é um país com clima temperado e verão seco segundo o Instituto Português do mar e da Atmosfera (IPMA), assemelhando-se com o clima observado na região costeira do Mar Mediterrâneo, vulgo bacia do mediterrâneo, onde este tipo de clima promove a atividade de vetores artrópodes durante o ano inteiro (Otranto & Dantas-Torres, 2010).

Tendo em conta que as doenças transmitidas por vetores são uma situação emergente, a existência de habitats propícios e as alterações climáticas observadas nas últimas décadas, potenciam a sobrevivência e manutenção dos vetores em determinados ecossistemas. Os vários tipos de atividades realizadas ao ar livre com animais de companhia, permitem o contato com os vetores locais e a propagação de vetores e parasitas que os próprios animais transportam para a fauna local (roedores, lagomorfos, felídeos, etc.) estabelecendo desta forma focos de infeção em zonas anteriormente designadas como não endémicas (Chomel, 2011; Gomes, 2015; Gramiccia, 2011; Helhazar, Leitão, Duarte, Tavares & Fonseca, 2013; Miró, Montoya, Roura, Gálvez & Sainz, 2013; Molina *et al.*, 2012; Pennisi, 2015; Shaw & Day, 2005). As transfusões de sangue são outra forma de infeção que têm revelado um importante papel na transmissão de parasitas, na medida em que a presença do vetor não é essencial. O sangue e os seus componentes, disponíveis para transfusões, têm sido alvo de inúmeros testes de diagnóstico para a deteção de agentes parasitários e infecciosos (Baneth, Koutinas, Solano-Gallego, Bourdeau & Ferrer, 2008; Irwin, 2009; Crawford, Walton, Lewis, Tasker & Warman, 2013; Shaw & Day, 2005; Solano-Gallego & Baneth, 2011).

Dos fatores associados à suscetibilidade do Homem a doenças zoonóticas, destacam-se as doenças imunossupressoras e a fragilidade imunitária das crianças e a idade sénior, visto que estas predis põem à maior prevalência de doenças zoonóticas como a Leishmaniose Visceral Humana (LVH) (Mencke, 2013; Molina *et al.*, 2012; Shaw & Day, 2005), a Anaplasmose Granulocítica Humana (AGH) (Nicholson, Allen, McQuiston, Breitschwerdt & Little, 2010; Sainz *et al.*, 2015) e a Febre Escaro

Nodular (FEN) (Brouqui, Parola, Fournier & Raoult, 2007; Louro *et al.*, 2005). As DCTV representam atualmente um problema de saúde global tanto em Medicina Veterinária como em Medicina Humana. O potencial zoonótico de algumas destas doenças revela a necessidade de conhecer e compreender a relação entre o agente da doença, o vetor e a resposta imunitária do hospedeiro, para adequar o tipo de profilaxia mais eficaz contra estas infeções, escolher os métodos de diagnóstico mais indicados e estabelecer um plano terapêutico o mais específico possível (Day, 2011).

Durante o estágio curricular foi possível observar vários animais que foram utilizados para a atividade da caça com quadro clínico compatível com DCTV. Infelizmente como mencionado atrás no Capítulo I, a limitação financeira dos proprietários condiciona a realização de análises completas e um diagnóstico específico, sendo a terapêutica instituída de acordo com os sinais clínicos e o conhecimento do Médico Veterinário sobre as diferentes DCTV mais prováveis de infetar os animais da região. O risco zoonótico de *Anaplasma phagocytophilum*, *Leishmania infantum* e *Rickettsia conorii*, sem desvalorizar os diferentes tipos de microfilárias com potencial zoonótico, alertaram para a necessidade de pesquisar a prevalência de infeção em cães de caça, não só pelo seu contato com os proprietários e com os profissionais de Medicina Veterinária (médicos, enfermeiros e auxiliares veterinários) mas também pela sua elevada exposição ao ciclo silvestre.

Estes cães contactam com pequenos roedores e outros mamíferos (felídeos inclusive) que possam estar estabelecidos na fauna silvestre que circunda o concelho de Loures (Gomes, 2015; Helhazar *et al.*, 2013; Maia, Ferreira, Nunes, Vieira, Campino & Cardoso, 2014; Molina *et al.*, 2012). Coinfeções com outros agentes de DCTV também podem estar implicados na fisiopatologia e no agravamento dos quadros clínicos frequentemente observados em cães (Caprariis *et al.*, 2011).

De entre os agentes de DCTV mais comuns observadas em Portugal (Alexandre *et al.*, 2009; Santos, 2014; Caeiros, 2012; Cardoso *et al.*, 2010; Cardoso, Tuna, Vieira, Yisaschar-Mekuzas & Baneth, 2010; Cardoso, Mendão & Carvalho, 2012; Maia *et al.*, 2015; Silva, 2011) destacam-se os seguintes para o presente estudo: *Anaplasma* spp., *Babesia* spp., *Ehrlichia canis*, *Dirofilaria immitis*, *Hepatozoon canis*, *Leishmania infantum*, *Mycoplasma* spp. e *Rickettsia conorii*.

O Homem é susceptível a alguns agentes de DCTV e os cães de caça estão expostos a ixodídeos com alguma frequência. Portanto a evidência de infeção ou coinfeções (agudas ou crónicas) detetadas em estudos epidemiológicos contribuem para alertar para o risco de infeção por estes agentes em determinadas áreas geográficas (Ebani *et al.*, 2015).

Embora a informação disponível em Portugal sobre a distribuição detalhada de alguns destes agentes em cães de caça seja reduzida, a sua deteção revela a necessidade de estudos mais elaborados, tanto na especiação dos agentes como na distribuição dos seus vetores. A autora pretende com este trabalho demonstrar a possível exposição dos cães de caça do concelho de Loures aos diferentes agentes de DCTV e explorar a necessidade de rever alguns conceitos junto dos proprietários para uma melhor compreensão das DCTV e a sua profilaxia, assim como alertar para os riscos de saúde animal e humana.

Capítulo III – Revisão bibliográfica

1. Agentes Etiológicos de Doenças Caninas Transmitidos por Ixodídeos

1.1 *Anaplasma* spp.

As bactérias *Anaplasma phagocytophilum* (antigamente designada *Ehrlichia phagocytophila*) e *Anaplasma platys* (antigamente designada *Ehrlichia platys*) pertencem ao género *Anaplasma* e à ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae (Mencke, 2013) e são bactérias Gram-negativas imóveis intracelulares obrigatórias (ESCCAP, 2012).

A. phagocytophilum é o agente da Anaplasmoze Granulocítica Canina (AGC) e infeta células da linha mielóide da medula óssea, nomeadamente os neutrófilos e raramente os eosinófilos (Diniz & Breitschwerdt, 2012) e *A. platys* infeta as plaquetas, sendo o agente da Anaplasmoze Trombocítica Canina (ATC) (Baneth, 2010). *A. platys* tem sido detetada em vários países da bacia do Mediterrâneo e sul da Europa embora os dados sobre a sua real prevalência sejam escassos. O vetor considerado como o mais provável é o ixodídeo *R. sanguineus* (Baneth, 2010; Sainz *et al.*, 2015).

A infeção por *A. platys* promove uma anemia normocítica e normocrómica moderada e uma trombocitopenia cíclica (Sainz *et al.*, 2015) com períodos de parasitemia com consequentes episódios de trombocitopenia de igual gravidade a cada 1-2 semanas (Harvey, 2012). A maioria das infeções por este agente apresentam-se subclínicas mas as infeções com manifestações clínicas demonstram geralmente linfadenomegalia e mucosas pálidas (Harvey, 2012). Embora a virulência desta espécie seja por norma baixa, a sua presença pode desempenhar um papel importante em coinfeções por agentes de DCTV (Cardoso *et al.*, 2015).

A deteção de mórulas de *A. platys* em plaquetas na observação de esfregaços sanguíneos é um método pouco sensível, no entanto a sensibilidade aumenta durante a fase aguda da doença, altura em que se observa maior percentagem de plaquetas parasitadas (Harvey, 2012; Sainz *et al.*, 2015).

Cardoso *et al.* (2015) detetaram *A. platys* em raposas sugerindo que estas atuam como reservatório da infeção para o cão doméstico.

Anaplasma phagocytophilum é o agente da Anaplasmoze Granulocítica Canina (AGC) e da Anaplasmoze Granulocítica Humana (AGH). Afeta uma grande variedade de hospedeiros como roedores, equinos, camelídeos, felinos domésticos, ruminantes, canídeos e o Homem, sendo estes dois últimos considerados hospedeiros acidentais. Esta bactéria conta com um ciclo de vida silvático e com diferentes habitats (Baneth, 2012). A diversidade genética de *A. phagocytophilum* é evidente, constando 262 estirpes e 230 isolados desta espécie na base de dados do *GenBank*. A prevalência desta infeção acompanha a distribuição do seu vetor principal, as carraças do género *Ixodes*, mais comuns em climas frescos e com diversas espécies distribuídas pelo hemisfério norte (Baneth, 2010; Diniz & Breitschwerdt, 2012). *Ixodes scapularis* e *I. pacificus* presentes a norte dos EUA; *I. ricinus* amplamente distribuída pela Europa; *I. persulcatus* presente na Ásia e Rússia e *I. trianguliceps* descrita no Reino Unido (Baneth, 2010; Carrade, Foley, Borjesson & Sykes, 2009; Diniz &

Breitschwerdt, 2012). Em Portugal, *A. phagocytophilum* foi detetada em *I. ricinus* e *I. ventralis* (Chomel, 2011; Santos, Alexandre, Sousa, Nuncio, Bacellar & Dumler, 2009; Silva, Santos, Formosinho & Bacellar *et al.*, 2006; Santos-Silva *et al.*, 2006).

Na Europa, a AGC tem sido descrita principalmente no centro e norte (ESCCAP, 2012; Sainz *et al.*, 2015), cujos hospedeiros reservatório são algumas espécies de veados, pequenos roedores e o lince, entre outros (Diniz & Breitschwerdt, 2012; ESCCAP, 2012).

A transmissão no vetor é transtadiária e a infeção do hospedeiro ocorre cerca de 36 a 48 horas após a fixação do vetor (Baneth, 2010). Não se observa predisposição racial ou de sexo na infeção por AGC (Diniz & Breitschwerdt, 2012; Sainz *et al.*, 2015).

A. phagocytophilum é capaz de induzir imunomodulação nos neutrófilos, facilitando a sua multiplicação e evasão da destruição pelo sistema imunitário do hospedeiro (Baneth, 2010). O mecanismo fisiopatológico da AGC é complexo e resulta em mielo e imunossupressão com aumento da suscetibilidade a infeções secundárias (Diniz & Breitschwerdt, 2012; Taylor, 2007) assim como destruição imunomediada de plaquetas (Kohn, Galke, Beelitz & Pfister, 2008). O período de incubação nos hospedeiros mamíferos ronda os 7 a 15 dias. Células infetadas são encontradas no sangue circulante e em tecidos do sistema fagocitário mononuclear como o baço, o fígado e a medula óssea (ESCCAP, 2012). A infeção por *A. phagocytophilum* tende a ser autolimitante e assintomática em cães imunocompetentes. Quando se desenvolve doença aguda surgem vários sinais clínicos não específicos com reduzida tendência para estabelecer doença crónica. Contudo não se conhecem casos com evolução fatal para os cães (Baneth, 2010; Diniz & Breitschwerdt, 2012). Os sinais clínicos são geralmente febre, letargia, anorexia, claudicação por poliartrite e dor músculo-esquelética. Outros sinais podem surgir, como mucosas pálidas, abdómen tenso, diarreia, vômito, petéquias, taquipneia, esplenomegalia e linfadenomegalia. Raramente se observa tosse, uveíte, edema dos membros, polidipsia e sinais neurológicos. As alterações laboratoriais mais comuns são trombocitopenia (em cerca de 90% dos cães), anemia normocítica e normocrómica ligeira a moderada, neutropenia ou neutrofilia, hipoalbuminémia, hiperglobulinémia, bilirrubinémia e o aumento da fosfatase alcalina (Baneth, 2010; Diniz & Breitschwerdt, 2012; ESCCAP, 2012; Kohn *et al.*, 2008; Sainz *et al.*, 2015; Taylor, 2007).

O diagnóstico obtém-se pela combinação da anamnese, sinais clínicos, alterações hematológicas e bioquímicas e os resultados obtidos em estudos citológicos, técnicas serológicas e moleculares (Diniz & Breitschwerdt, 2012; ESCCAP, 2012). A deteção de mórulas de *A. phagocytophilum* em neutrófilos do sangue circulante, ou outros fluídos corporais, é um bom indicador de infeção durante a fase aguda, aparecendo em mais de metade dos cães diagnosticados por PCR (Kohn *et al.*, 2008). As mórulas de *A. phagocytophilum* detetadas em esfregaços de sangue tendem a ser mais numerosas do que as mórulas de *Ehrlichia canis* (Baneth, 2010). Técnicas serológicas como ELISA, IFI e Western Blotting, permitem a titulação de anticorpos (Ac), contudo a sua interpretação deve ser realizada em conjunto com a anamnese e sinais clínicos, pois os Ac podem permanecer detetáveis até 24 meses após a

infecção. Um resultado positivo poderá ser indicador de exposição prévia ao parasita ou infecção ativa (Baneth, 2010; Carrade *et al.*, 2009; Diniz & Breitschwerdt, 2012). Em infecções agudas, a pesquisa de anticorpos pode apresentar um resultado negativo, visto que a seroconversão ocorre entre uma a quatro semanas após a infecção e até cinco dias após a detecção de mórulas (ESCCAP, 2012; Carrade *et al.*, 2009). Os casos suspeitos de AGC com resultado serológico negativo ou positivo com titulação baixa (1:50) devem ser reavaliados num intervalo de duas a quatro semanas após o início dos sintomas. O aumento significativo da titulação de Ac numa reavaliação permite confirmar a presença de infecção ativa (Carrade *et al.*, 2009). Recomenda-se complementar a análise serológica com técnicas moleculares de modo a identificar a espécie envolvida. Os métodos serológicos admitem a reação cruzada com *A. platys* em zonas com ambas as espécies do género *Anaplasma* spp. (Carrade *et al.*, 2009). A presença de ADN da bactéria é evidência de infecção ativa e a administração de antibioterapia pode reduzir a carga bacteriana (Sainz *et al.*, 2015).

O tratamento de eleição para as infecções por *Anaplasma* spp. são os antibióticos da família das tetraciclinas, nomeadamente a doxiciclina que demonstra igual eficácia e segurança em relação a outras tetraciclinas. A associação com corticosteróides (prednisolona ou prednisona) pode ser benéfica no controlo de complicações imunomediadas. A resposta ao tratamento é célere (24 a 48 horas) e caso não se observe melhoria do quadro clínico é necessário reavaliar e reconsiderar outros agentes infecciosos transmitidos por carraças (Diniz & Breitschwerdt, 2012; ESCCAP, 2012; Sainz *et al.*, 2015).

A infecção do Homem por *A. phagocytophilum* tem importância zoonótica. Ao provocar a AGH, uma doença caracterizada por um quadro clínico febril, mialgias, alterações gastrointestinais, aumento das enzimas hepáticas e trombocitopénia. A mortalidade é bastante baixa (<1%) e geralmente associada a infecções concomitantes oportunistas (Nicholson *et al.*, 2010; Sainz *et al.*, 2015). No Homem, assim como nos cães (Sainz *et al.*, 2015), a transmissão de *A. phagocytophilum* também ocorre através de transfusão sanguínea (Annen, Friedman, Esho, Horowitz, Gottschall & Straus, 2012; Kemperman, Neitzel, Jensen *et al.* 2008; Saqinz *et al.*, 2015) e infecção perinatal (Dhand, Nadelman, Aguerro-Rosenfeld, Haddad, Stokes & Horowitz, 2007).

As estirpes que infetam o Homem nos EUA são mais virulentas e apresentam maior taxa de mortalidade do que as estirpes encontradas na Europa (Diniz & Breitschwerdt, 2012). O cão doméstico tem um papel importante como espécie sentinela na exposição do Homem a carraças infetadas por *Anaplasma phagocytophilum* (Carrade *et al.*, 2009; Sainz *et al.*, 2015).

1.2 Babesia spp.

A Babesiose Canina (BC) é uma infecção provocada por protozoários intraeritrocitários do género *Babesia*, filo Apicomplexa, família Babesiidae (Taylor, Coop & Wall, 2007). Estes protozoários, também designados de babesias ou piroplasmas (devido ao seu formato piriforme), contam com mais de 100 espécies, infetando mamíferos (domésticos e selvagens) e o Homem. Transmitido por

diferentes espécies de carraças, o género *Babesia* tem dois tipos de morfologia, as grandes babesias (3,0 – 5,0 µm) representadas pela espécie *Babesia canis* e as pequenas babesias (1,5 – 2,5 µm) representadas por *Babesia gibsoni*. Outras espécies de babesias, identificadas através de métodos moleculares, também já foram descritas como agentes de BC, tais como *Babesia conradae* (Kjemtrup, Wainwright, Miller, Penzhorn & Carreno, 2006); *Babesia microti-like* (Simões, Cardoso, Araújo, Yisaschar-Mekuzas & Baneth, 2011); uma espécie de grande babesia ainda sem designação (Solano-Gallego & Baneth, 2011); *Babesia caballi*; *Theileria equi*; *Theileria annulata* e uma espécie do género *Theileria* spp. não identificada (Cardoso *et al.*, 2010; Solano-Gallego, Trotta, Carli, Carey, Caldin & Furlanello, 2008).

As grandes babesias, anteriormente descritas como subespécies da espécie *Babesia canis*: *B. canis canis*, *B. canis vogeli* e *B. canis rossi*, são atualmente consideradas como 3 espécies individuais ligadas ao género *Babesia* (Cacciò *et al.*, 2002; Zahler *et al.*, 1998). Esta divisão foi realizada com base em diferenças na distribuição geográfica, especificidade de vetores, sinais clínicos e características genéticas. São agora denominadas *Babesia canis* (patogenicidade média a grave), *Babesia vogeli* (a menos patogénica) e *Babesia rossi*, a mais patogénica (Cacciò *et al.*, 2002; Ebani *et al.*, 2015; Solano-Gallego & Baneth, 2011; Zahler *et al.*, 1998).

A distribuição geográfica de cada agente da BC está relacionada com a distribuição de cada vetor ixodídeo (Solano-Gallego & Baneth, 2011). *Babesia canis* é transmitida pelo ixodídeo *Dermacentor reticulatus* que predomina em zonas de clima mais fresco, como o centro e o norte da Europa, (Cardoso *et al.*, 2008) e também em África (Birkenheuer, 2012; Cardoso *et al.*, 2008). *B. canis* também pode ser transmitida por *Rhipicephalus sanguineus*, amplamente distribuído pela Europa (Solano-Gallego & Baneth, 2011). *Babesia vogeli* é transmitida por *Rhipicephalus sanguineus*, com uma grande distribuição no Velho e Novo Mundos (Solano-Gallego & Baneth, 2011) e *Babesia rossi* é transmitida por *Haemaphysalis elliptica* (antes *H. leachi*) descrita em África (Birkenheuer, 2012; Solano-Gallego *et al.*, 2008; Taylor *et al.*, 2007) e mais recentemente identificada no Sudão (Oyamada *et al.*, 2005). A pequena *Babesia gibsoni* é transmitida por *Haemaphysalis bispinosa* e *Rhipicephalus sanguineus* (Duarte, Louly, Neto, Romanowski, Junior & Linhares, 2008) também com uma grande distribuição no Velho e Novo Mundos (Solano-Gallego & Baneth, 2011). *Babesia micro-like* (ou *Theileria annae*) estima-se endémica no noroeste de Espanha (Cardoso *et al.*, 2010; Solano-Gallego *et al.*, 2008; Solano-Gallego & Baneth, 2011) e com casos reportados no norte de Portugal (Simões *et al.*, 2011). O vetor implicado ainda não está completamente identificado, considerando-se *Ixodes hexagonus* como o mais provável (Birkenheuer, 2012; Camacho *et al.*, 2003).

Em Portugal a infeção por *Babesia* spp. encontra-se em todo o território nacional (Caeiros, 2012), no entanto não há dados concretos sobre a caracterização genética da distribuição de cada espécie ao longo de todo o território nacional (Cardoso *et al.*, 2008). As espécies *Babesia microti-like* (Simões *et al.*, 2011), *Babesia canis* e *Babesia vogeli* já foram todas identificadas no norte de Portugal (Cardoso *et al.*, 2008; Cardoso *et al.*, 2010; Rodrigues, 2014).

A transmissão de *Babesia* spp. ocorre através de vetores ixodídeos e a infecção permanece no vetor durante gerações após uma só ingestão de sangue infetado, devido à sua transmissão transtadial e transovárica (Solano-Gallego & Baneth, 2011). A espécie *Babesia gibsoni* pode ser transmitida diretamente entre hospedeiros definitivos, designadamente em cães da raça *Pitt Bull Terrier* por ocasião de mordeduras e ingestão de sangue infetado (Irwin, 2009; Solano-Gallego & Baneth, 2011). A transmissão de *Babesia* spp. também pode ocorrer através de transfusão sanguínea (Dantas-Torres & Figueredo, 2006).

A infecção inicia-se quando o ixodídeo inocula os esporozoítos de *Babesia* spp. na pele do hospedeiro durante uma refeição sanguínea. Após a entrada dos esporozoítos na corrente sanguínea, estes ligam-se à membrana dos eritrócitos e invadem-nos, originando trofozoítos (formas anulares) que, após reprodução assexuada por esquizogonia, originam merozoítos com forma redonda ou piriforme. Após a lise dos eritrócitos (provocada pelos merozoítos), alguns destes ficam livres na corrente sanguínea para infetarem novas células e outros permanecem nos eritrócitos, evoluindo para gamontes. Quando os gamontes são ingeridos pelos ixodídeos, durante uma refeição hematófaga, continuam a sua maturação sexual dentro do vetor e, por esporogonia, conduzem à formação de esporozoítos (forma infetante) que permanecem nas glândulas salivares dos ixodídeos até à próxima refeição hematófaga (Schnittger, Rodriguez, Florin-Christensen & Morrison, 2012; Solano-Gallego & Baneth, 2011).

As infeções por *Babesia* spp. podem apresentar-se desde subclínicas a hiperagudas e o quadro clínico é geralmente caracterizado por febre, mucosas pálidas ou ictéricas, esplenomegália, fraqueza e colapso, devido a hemólise e consequente hipóxia tecidual, resposta inflamatória sistémica, trombocitopenia e hematúria (Irwin, 2009). A apresentação e gravidade clínica da BC depende de fatores inerentes ao hospedeiro, como a idade, o estatuto imunitário, as doenças ou infeções concomitantes e resposta imunitária à infeção, assim como a espécie envolvida (Cardoso *et al.*, 2008; Solano-Gallego & Baneth, 2012). Conforme o quadro clínico presente, a BC pode ser descrita como “não complicada” ou “complicada”. Apesar da primeira forma clínica também poder culminar na morte do animal (Birkenheuer, 2012), a BC “complicada” está geralmente ligada a infeções pelas espécies *B. canis* e *B. rossi*, com compromisso do sistema circulatório, doença renal e/ou hepática aguda, anemia hemolítica imunomediada, hemoconcentração, coagulopatias, sinais neurológicos e choque (Matijatko *et al.*, 2010; Solano-Gallego, 2011).

As infeções por *Babesia vogeli* são extremamente patogénicas para cachorros e adultos com doenças e/ou infeções concomitantes, no entanto, em adultos saudáveis são geralmente subclínicas (Irwin, 2009; Schnittger *et al.*, 2012; Solano-Gallego & Baneth, 2011) e não possuem um padrão homogéneo de sintomas mas tendem a provocar uma anemia hemolítica regenerativa. A BC por *Babesia canis* apresenta patogenicidade moderada a grave com um padrão caracterizado por trombocitopenia em quase 100% dos cães (Matijatko, Mrljak, Kis, Kucer, Forsek, Zivicnjak, Romié, Simec & Ceron, 2007), anemia hemolítica não regenerativa, neutropenia, aumento das proteínas da fase aguda,

hipoproteinémia e hemoglobinúria, e maior probabilidade de provocar doença renal aguda (Solano-Gallego *et al.*, 2008).

O diagnóstico de infecções por *Babesia* spp. pode ser realizado através da observação de esfregaços sanguíneos, execução de testes serológicos e por detecção de ADN. A baixa e intermitente parasitémia é um obstáculo na detecção da babesiose crónica, sendo essencial conhecer a história clínica, epidemiologia e sinais clínicos de um animal suspeito de infeção (Farkas, 2013).

O diagnóstico molecular por PCR permitiu aumentar a sensibilidade e especificidade na detecção e especiação das diferentes grandes babésias e na presença de baixos níveis de parasitémia (Cardoso *et al.*, 2008), no entanto é uma técnica disponível em poucos laboratórios. Apesar das técnicas desenvolvidas não está preconizado um teste *gold-standard* para diagnóstico da BC (Birkenheuer, 2012).

Nos casos de suspeita de BC, ou na testagem de dadores de sangue, recomenda-se repetir a PCR e complementar com técnicas serológicas (Irwin, 2009; Solano-Gallego & Baneth, 2011). Birkenheuer (2012) defende o *screening* de infecções por *Babesia* através de PCR concebido para detecção de *Babesia* spp., a fim de evitar um resultado falso negativo para uma determinada espécie. Os métodos serológicos, como a IFI ou o ELISA têm sido utilizados com frequência em estudos epidemiológicos e no diagnóstico clínico (Birkenheuer, 2012; Farkas, 2013; Solano-Gallego, 2011).

As infecções por grandes babésias são geralmente tratadas com o dipropionato de imidocarb e/ou o aceturato de diminazeno (Irwin, 2009; Solano-Gallego & Baneth, 2011; Vial & Gorenflot, 2006). É de salientar que o dipropionato de imidocarb, no tratamento e profilaxia das infecções por grandes babésias, elimina a infeção no hospedeiro e limita a capacidade infetante de ixodídeos quando se alimentam em animais infetados, demonstrando também atividade profilática durante cerca de 6 semanas após uma única administração injetável (Birkenheuer, 2012), contudo nem todos os autores concordam com a utilização profilática destes fármacos (Solano-Gallego & Baneth, 2011). Pode ser necessário instituir tratamento de suporte através de fluidoterapia, transfusões sanguíneas e administração de anti-inflamatórios (Birkenheuer, 2012; Solano-Gallego & Baneth, 2011; Vial & Gorenflot, 2006).

O controlo dos vetores ixodídeos é fundamental no controlo da transmissão de *Babesia* spp. entre hospedeiros, revelando-se bastante complexo em zonas endémicas. As vacinas contra a BC disponíveis na Europa são elaboradas com antígeno de *B. canis* e *B. rossi*, contudo não atuam na diminuição da parasitémia nem conferem imunidade cruzada. Estas vacinas atuam na atenuação dos sinais clínicos da doença pela estimulação da imunidade protetora. Em zonas endémicas da Europa a sua administração a cada seis meses confere proteção durante as alturas de maior prevalência da doença: primavera e outono (Birkenheuer, 2012; Schetters *et al.*, 2006; Schetters, Kleuskens, Scholtes, Gorenflot, Moubri & Vermeulen, 2001; Irwin, 2009; Solano-Gallego & Baneth, 2011).

Em Portugal estão disponíveis duas vacinas licenciadas: a Pirodog® e a Novibac® Piro. Estas vacinas são constituídas por antígenos parasitários solúveis produzidos pelos parasitas, derivados de culturas *in vitro* de uma única estirpe de *B. canis*, no caso da Pirodog®, e de uma estirpe de *B. canis* e outra de *B. rossi*, no caso da Nobivac® Piro (Caeiros, 2012).

Casos de babesiose humana provocados por espécies de *Babesia* que infetam o cão não se encontram descritos.

1.3 *Ehrlichia canis*

Ehrlichia canis é uma bactéria cocóide Gram-negativa e intracelular obrigatória, da ordem Rickettsiales e da família Anaplasmataceae (Mencke, 2013). Invade monócitos e macrófagos, apresentado uma forma intracelular denominada mórula (Harrus, Waner & Neer, 2012), provocando a Erliquiose Monocítica Canina (EMC), uma doença multissistémica. Esta bactéria, com hospedeiros definitivos na Família Canidae (domésticos ou selvagens), foi a única espécie do género *Ehrlichia* spp. a ser isolada em canídeos na Europa, sendo endémica na bacia do Mediterrâneo (René-Martellet *et al.*, 2015; Sainz *et al.*, 2015), enquanto outras espécies de *Ehrlichia* spp. são encontradas nos EUA, como *E. ewingii*, *E. ruminantium* e *E. chaffeensis* (Harrus *et al.*, 2012). A bactéria *E. canis* encontra-se também na Ásia, América, África e Japão, não tendo sido ainda identificada na Austrália (Harrus *et al.*, 2012). O ADN de *Ehrlichia* spp. já foi detetado em felinos domésticos a sul de Portugal (Maia *et al.*, 2014) e em felinos selvagens no Brasil (Braga, André, Freschi, Teixeira & Machado, 2012). O vetor primário de *E. canis* é o ixodídeo *Rhipicephalus sanguineus*, com transmissão transtestual mas não transovárica (Dantas-Torres, 2008; Taylor, 2007). Este ixodídeo é abundante na bacia do Mediterrâneo, hiberna durante os meses frios em zonas protegidas no meio urbano (canis e jardins) e torna-se mais ativo durante a primavera até o início do outono. A infeção por *E. canis* através da picada de *R. sanguineus* ocorre até 3 horas após a sua fixação no hospedeiro. Outra forma de transmissão ocorre através de transfusão sanguínea (Sainz *et al.*, 2015). O tempo de incubação ronda entre os 8 aos 20 dias, com multiplicação dentro dos leucócitos e consequente formação de mórulas dentro de células mononucleares, disseminando-se através do sistema fagocitário mononuclear até ao baço, fígado e linfonodos, originando trombopatias e trombocitopenia por sequestro e destruição de plaquetas (ESCCAP, 2012). Após a incubação, a doença evolui com 3 fases: a primeira fase é aguda com duração de uma a quatro semanas, da qual os animais recuperam com o tratamento adequado, a segunda fase é subclínica, podendo durar meses a anos, encontrando-se os animais infetados e assintomáticos (Harrus *et al.*, 1998), e a terceira fase: a crónica. Nem todos os cães infetados alcançam a fase crónica da doença, desconhecendo-se ainda os fatores que a condicionam (Baneth, 2010; Harrus *et al.*, 2012). Alguns autores reconhecem que a raça Cão de Pastor Alemão demonstra uma elevada suscetibilidade à EMC devido à sua fraca resposta imunitária celular (Harrus, Kass, Klement & Waner, 1997; Harrus *et al.*, 2012; Neer, Breitschwerdt, Greene & Lappin, 2002).

A EMC ocorre geralmente nas épocas mais quentes do ano, contudo a parasitemia persistente característica de *E. canis* pode despoletar a doença durante o ano inteiro (Harrus & Waner, 2013).

Os sinais clínicos mais comuns durante a fase aguda são letargia, anorexia, perda de peso, palidez das mucosas, coagulopatias e trombocitopatias (petéquias, equimoses e epistaxis), febre, rinorreia, secreções oculares, linfadenomegalia, esplenomegalia e hepatomegalia. Raramente surgem sinais neurológicos (meningoencefalite), oculares (uveíte e retinopatias), dispneia, edema dos membros e/ou do escroto (Breitschwerdt, 2005; Harrus *et al.*, 2012; Sainz *et al.*, 2015; Sherding, 2006). Os sinais clínicos da fase crônica podem ser bastante semelhantes aos da fase aguda, distinguindo-se a hipoplasia da medula óssea e uma acentuada pancitopenia na fase crônica (Neer *et al.*, 2002; Sainz *et al.*, 2015). O quadro clínico pode complicar-se devido a coinfeções com outros agentes que partilham o mesmo vetor (Caprariis *et al.*, 2011; René-Martellet *et al.*, 2015). A trombocitopenia é a alteração hematológica mais comum, observada em cerca de 80% dos cães infetados (Neer *et al.*, 2002), surgindo em média, 10 a 20 dias após a infeção (Breitschwerdt, 2005). As alterações laboratoriais que se podem observar são a anemia normocítica normocrômica, neutropenia ou neutrofilia, linfopenia, monocitose, hiperproteinemia com hipergamaglobulinemia (geralmente policlonal), hipoalbuminemia, proteinúria, aumento das enzimas hepáticas e azotemia (Saiz *et al.*, 2015).

A confirmação de infeção pode passar pela observação de citologias, resultados de testes serológicos e de técnicas moleculares (Mylonakis *et al.*, 2003; Sainz *et al.*, 2015). As mórulas de *E. canis* também podem ser observadas em leucócitos de amostras de líquido cefalorraquidiano e de líquido sinovial (Sherding, 2006) e em citologias de aspirados de baço (Faria *et al.*, 2010). Apesar de tudo, a observação de citologias é pouco sensível, recomendando-se a aplicação de métodos serológicos e moleculares para complementar o diagnóstico (Mylonakis *et al.*, 2003; Sainz *et al.*, 2015).

O diagnóstico é uma combinação da anamnese, dos sinais clínicos, das alterações hematológicas e resultados serológicos e moleculares. Sendo o agente *E. canis* transmitido pelo ixodídeo *R. sanguineus*, a pesquisa de outros agentes transmitidos pelo mesmo vetor também deve ser considerada, tais como *Babesia* spp., *Hepatozoon canis* e *Rickettsia conorii* (Harrus *et al.*, 2012; Taylor, 2007).

Durante o período de incubação e na fase aguda da doença é improvável a deteção de Ac anti-*E. canis*, no entanto, duas a quatro semanas após a infeção os Ac atingem níveis que permitem a sua deteção através de métodos serológicos (ESCCAP, 2012; Harrus & Waner, 2011; Sainz *et al.*, 2015). Os Ac produzidos no decorrer da infeção não conferem imunidade protetora e podem inclusivé contribuir para a deterioração do estado de saúde do hospedeiro (Mylonakis, Siarkou & Koutinas, 2010).

A titulação de Ac por IFI é um método muito sensível, no entanto podem ocorrer reações cruzadas com *E. chaffeensis* e *E. ewingii* (Harrus & Waner, 2011; Neer *et al.*, 2002; Sainz *et al.*, 2015).

A utilização de IFI em zonas endémicas de *Ehrlichia* spp. carece de interpretação adequada dos sinais clínicos e alterações laboratoriais, podendo apenas evidenciar infeção anterior e não infeção ativa (ESCCAP, 2012). Titulações de 1:40, ou superiores, são evidência de exposição ao agente. Dois resultados consecutivos, com duas semanas de intervalo, que demonstrem um aumento igual ou quatro

vezes superior ao valor da primeira titulação, são indicativos de infecção ativa (Harrus & Waner, 2013; Sainz *et al.*, 2015). Testes rápidos com base na imunocromatografia ou ELISA estão disponíveis para diagnóstico *in situ*, facilitando a confirmação de infecção (ESCCAP, 2012). Estes testes possuem sensibilidade para detetar titulações de 1:100 ou superiores (Neer *et al.*, 2002). A detecção de Ac através de ELISA permite identificar infecção específica de cada espécie de *Ehrlichia* spp., evitando as reações cruzadas observadas na IFI (Cárdenas *et al.*, 2007). É recomendado repetir a a titulação de Ac duas semanas após um resultado negativo inicial em animais suspeitos de EMC (Neer *et al.*, 2002). Outras técnicas serológicas estão disponíveis, com aplicação na área da investigação, sem uso na prática clínica diária, como Western blotting (Baneth, 2005) e o isolamento em cultura de células (Baneth, 2005; Harrus & Waner, 2011).

Técnicas moleculares como a PCR são utilizadas em conjunto com técnicas serológicas. A PCR convencional e a quantitativa (qPCR), detetam a presença do parasita antes da seroconversão e indicam a presença de infecção ativa em vez de apenas exposição antiga (Harrus *et al.*, 2011). A PCR convencional possui maior propensão a falsos positivos e falsos negativos por fragilidade da própria técnica (Harrus *et al.*, 2011), no entanto é bastante sensível em amostras de baço, sangue e medula óssea (Harrus *et al.*, 2004; Harrus *et al.*, 2011; Sherding, 2006). Já Baneth *et al.* (2009) confirmaram a possibilidade de diagnosticar infecção de *E. canis* por RT-PCR a partir de zaragatoa conjuntival (recolha de amostra minimamente invasiva). A técnica qPCR revelou-se mais sensível que a PCR convencional e permite inclusive quantificar a carga parasitária, sendo um dos métodos mais utilizados na confirmação da infecção (Baneth, Harrus, Ohnona & Schlesinger, 2009; Harrus *et al.*, 2012). Um resultado PCR positivo confirma a infecção mas um resultado negativo não a exclui (ESCCAP, 2012).

A EMC pode ser tratada com recurso a antibióticos da família das tetraciclina e com cloranfenicol. Tanto a oxitetraciclina como a tetraciclina têm sido usadas até atualmente, no entanto a doxiciclina e a minociclina têm vindo a demonstrar elevada eficácia. A doxiciclina, em particular, tem uma excelente penetração na barreira hematoencefálica e maior tempo de semi-vida, tornando-se no princípio ativo de eleição a administrar durante, pelo menos, quatro semanas (Harrus *et al.*, 2012). O cloranfenicol caiu em desuso devido ao seu perigoso efeito mielossupressor (Harrus *et al.*, 2012). Embora a melhoria clínica seja evidente nas primeiras 24-48 horas durante a fase aguda e subclínica, na maioria dos casos a eliminação total do parasita pode não ser atingida. O objetivo do tratamento não deve ser a seronegatividade mas sim resultados PCR negativos (Sainz *et al.*, 2015). O tratamento do animal na fase crónica é complexo e geralmente não responde tão bem à antibioterapia devido às alterações sistémicas e à grave hipoplasia da medula óssea (Harrus *et al.*, 2012; Shipov, Klement, Reuveni-Tager, Waner & Harrus, 2008).

Apesar da administração de dipropionato de imidocarb estar descrita, a sua eficácia não é tão boa como a da doxiciclina (Sainz *et al.*, 2015). Os resultados da contagem plaquetária e da eletroforese de proteínas demoram mais tempo a regressar aos valores normais quando se administra o dipropionato de imidocarb do que um protocolo que utilize apenas doxiciclina (Sainz *et al.*, 2000). Os

corticosteroides (prednisona ou prednisolona) são uma opção na presença de complicações imunomediadas, tais como: anemia hemolítica imunomediada, trombocitopénia, uveíte, glomerulonefrite, vasculite, poliartrite, etc (Sainz *et al.*, 2015; Sherding, 2006).

Animais tratados corretamente podem mesmo assim permanecer infetados com *E. canis* (McClure *et al.*, 2010; Sainz *et al.*, 2015). Um animal pode ser considerado livre da doença quando se observa recuperação clínica e melhoria das alterações hematológicas e bioquímicas com resolução da hiperproteinémia (Neer *et al.*, 2002).

As técnicas serológicas não são adequadas para monitorizar o tratamento, pois os níveis de anticorpos podem permanecer elevados mais de 11 meses após eliminação do parasita, sendo o aumento da contagem plaquetária um bom indicador de recuperação clínica em infeções subclínicas (Harrus, Waner, Aizenberg & Bark, 1998). A técnica PCR é específica e sensível na deteção da infeção por *E. canis* e na monitorização após o tratamento antimicrobiano (Wen *et al.*, 1997). O ADN do parasita poderá deixar de ser detetado quando o animal é submetido a uma correto esquema de antibioterapia (Sainz *et al.*, 2015).

Não existe de momento uma vacina para a prevenção da EMC (Harrus *et al.*, 2012) contudo, um estudo recente estudou uma vacina elaborada com base numa estirpe de *E. canis* atenuada (Rudoler, Baneth, Eyal, Straten & Harrus, 2012).

Apesar da infeção por uma estirpe de *E. canis* já ter sido isolada num humano na Venezuela (Unver, Perez, Orellana, Huang & Rikihisa, 2001; Perez, Rikihisa & Wen, 1996), na ausência de casos semelhantes não se considera relevante o seu potencial zoonótico (Harrus *et al.*, 2012; Nicholson *et al.*, 2010).

1.4 *Hepatozoon canis*

Hepatozoon canis é um protozoário do filo Apicomplexa, família Hepatozoidae, género *Hepatozoon*, transmitido por artrópodes ixodídeos (Baneth, 2012) e provoca a Hepatozoonose Canina (HC). A sua transmissão, ao contrário da maioria das infeções através de vectores ixodídeos, não ocorre pela picada do vetor mas sim pela sua ingestão (Baneth, 2012). Existem inúmeras espécies do género *Hepatozoon* que infetam as mais variadas espécies, desde anfíbios, répteis, aves, marsupiais e mamíferos, incluindo o Homem (Baneth, 2012). As espécies de *Hepatozoon* que infetam o cão doméstico são duas: *H. canis* e *H. americanum* (Baneth, Barta, Shkap, Martin, Macintire & Vincent-Johnson, 2000; Baneth, 2012). *Hepatozoon canis* é prevalente a sul da Europa, Médio Oriente, África, Ásia, Brasil, América do Sul e ilhas das Caraíbas (Baneth, 2012). Em zonas não endémicas para *H. canis*, como a Alemanha (Menn, Lorentz & Naucke, 2010) e os Países Baixos, já foram detetadas infeções por este protozoário em animais importados (Baneth, 2012). Infeções por *H. canis* já foram descritas em canídeos e felinos (domésticos e selvagens), assim como em raposas (*Vulpes vulpes*) (Baneth, 2012; Cardoso *et al.*, 2014).

A distribuição de *H. canis* está relacionada com a distribuição do seu principal vetor, o ixodídeo *Rhipicephalus sanguineus*. Adaptado a climas quentes e temperados, este ixodídeo é das espécies mais disseminadas em todo o mundo (Baneth, 2012). Outras espécies de ixodídeos também estão implicadas na transmissão de *Hepatozoon canis*, como *Amblyomma ovale* (Forlano, Scofield, Elisei, Fernandes, Ewing & Massard, 2005; Rubini, Paduan, Lopes & O'Dwyer, 2008) e *Rhipicephalus boophilus* no Brasil (Baneth, 2012), *Haemaphysalis longicornis* e *Haemaphysalis flava* no Japão (Baneth, 2012). A transmissão deste parasita em *Rhipicephalus sanguineus* é transestadial (Baneth, 2012). A infecção vertical de *Hepatozoon canis* de progenitora para cachorros já foi demonstrada por Forlano *et al.* (2007).

As espécies de *Hepatozoon* spp. que infetam répteis, aves, e anfíbios produzem gametócitos na linha eritróide, e as espécies que infetam os mamíferos ocorrem dentro dos leucócitos (Baneth, 2012; Potter & Macintire, 2010). Na HC, após a ingestão de ixodídeos infetados, os esporozoítos são libertados, penetram a mucosa intestinal e disseminam-se através do sangue e da linfa a vários órgãos, incluindo o baço, a medula óssea, o pulmão, o fígado e o rim, podendo originar pneumonia, hepatite e glomerulonefrite. Nestes órgãos ocorre a formação de merontes, formas parasitárias que sofrem ciclos de merogonia e libertam merozoítos que invadem leucócitos (geralmente neutrófilos e mais raramente monócitos) e formam gamontes (forma elipsoide) que circulam no sangue periférico até ocorrer eventualmente a sua ingestão por outro ixodídeo, infetando-o (Otranto *et al.*, 2011; Baneth, Mathew, Shkap, Macintire, Barta & Ewing, 2003). A infecção geralmente é assintomática em cães adultos saudáveis. Já em cães jovens, debilitados, imunodeprimidos, com infeções ou doenças concomitantes (*Leishmania infantum*, *Babesia* spp., *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* e *Toxoplasma gondii*) demonstram agravamento do quadro clínico que se pode revelar fatal (Baneth *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2009).

O tempo que decorre entre a infecção e o aparecimento de sinais clínicos ronda os 28 dias (Taylor *et al.*, 2007). A apresentação da doença é geralmente subclínica em casos de baixa parasitémia e em animais saudáveis. Em situações de doença debilitante o animal pode apresentar letargia, febre, anorexia, perda de peso e linfadenomegália (Baneth, 2011; Otranto *et al.*, 2011). Nos resultados laboratoriais a alteração mais comum é a anemia normocítica normocrômica, por vezes regenerativa. A contagem de leucócitos pode estar normal ou aumentada, observando-se neutrofilia acentuada em parasitémias elevadas, com quase 100% dos neutrófilos parasitados com gamontes. Pode surgir também hiperglobulinémia e hipoalbuminémia, assim como aumentos séricos de fosfatase alcalina e creatinina quinase (Baneth & Weigler, 1997; Baneth, 2011, 2012). Um terço dos cães infetados demonstra trombocitopénia, provavelmente associada à coinfeção com outros hemoparasitas (Baneth, 2011, 2012). Raramente se observam sinais neurológicos e envolvimento do sistema músculo-esquelético (Marchetti, Lubas, Baneth, Modenato & Mancianti, 2009).

A técnica mais utilizada e acessível é a observação microscópica de citologias da camada flogística ou da medula óssea, coradas com Giemsa ou Diff-Quik (Otranto *et al.*, 2011). Torna-se possível

identificar os gamontes em forma de “barril” com cerca de 11 µm por 4 µm, dentro dos neutrófilos e mais raramente nos monócitos (Taylor *et al.*, 2007). A histopatologia de tecidos infectados permite identificar merozoítos com a forma característica de “roda raiada” (Baneth, 2011). Também é possível recorrer a métodos serológicos bastante fidedignos no reconhecimento de contato recente com o antígeno de *Hepatozoon canis*, quando a parasitemia é baixa ou quase ausente, ou em infecções crônicas (Baneth, 1998) citado por Otranto *et al.* (2011). Técnicas serológicas como IFI (Baneth, Shkap, Samish, Pipano & Savitsky, 1998), ELISA (Gonen, Strauss-Ayali, Shkap, Vincent-Johnson, Macintire & Baneth, 2004) e Western Blotting (Taylor *et al.*, 2007) são os métodos mais comumente utilizados em estudos epidemiológicos (Baneth, 2011). A técnica de PCR em sangue total ou na camada flogística é específica e sensível, tendo contribuído muito para a caracterização genética das infecções (Otranto *et al.*, 2011) e na monitorização da resposta ao tratamento (Li *et al.*, 2008; Criado-Fornelio *et al.*, 2007).

A HC é tratada com dipropionato de imidocarb (Baneth & Weigler, 1997; Baneth, 2012; Sherding, 2006). Alguns autores recomendam a administração quinzenal de imidocarb até desaparecerem os gamontes nos esfregaços, podendo prologar-se por oito ou mais semanas, no entanto raramente se observa a eliminação total do parasita (Baneth & Weigler, 1997; Baneth, 2012; Marchetti *et al.*, 2009). Apesar da remissão dos sinais clínicos, recomenda-se associar técnicas moleculares à observação dos esfregaços, na monitorização da carga parasitária e resposta ao tratamento (Sasanelli, Paradies, Greco, Eyal, Zaza & Baneth, 2010). Com frequência é associada doxiciclina ao dipropionato de imidocarb, durante 3 semanas, com a intenção de tratar infecções concomitantes transmitidas também por carrapatos, como *Ehrlichia canis* ou *Anaplasma* spp. (Baneth *et al.*, 2003; Baneth, 2012; Taylor, 2007). Anti-inflamatórios não esteróides podem ser utilizados no controlo da febre, dor e desconforto, já os corticosteróides são contraindicados pelo seu potencial imunossupressor, podendo piorar o quadro clínico (Lappin, 2005; Sherding, 2006). O prognóstico é mais favorável em animais adultos com menor parasitemia do que em cachorros ou adultos com elevada parasitemia e imunossupressão (Baneth, 2012; Taylor, 2007).

Não há vacinas disponíveis para a prevenção de infecções por *Hepatozoon* spp. (Baneth, 2011).

Embora não esteja descrita a transmissão deste parasita através da ingestão de pequenos predadores infectados com *H. canis*, é boa prática evitar que os cães ingiram pequenos mamíferos (Baneth, 2012).

Apesar desta infecção circular em carrapatos encontradas no cão doméstico, a transmissão para pessoas parece ser improvável e não há evidência de risco zoonótico (Lappin, 2005; Sherding 2006). Existe apenas um registo de infecção por *Hepatozoon* spp. nas Filipinas, diagnosticado em 1971 (Baneth, 2012).

1.5 *Mycoplasma* spp.

Os hemoplasmas caninos (também designados micoplasmas hemotrópicos) são bactérias Gram-negativas pleomórficas, desprovidas de parede celular e de difícil cultivo em meios laboratoriais, que

parasitam a periferia dos eritrócitos e provocam a Hemoplasmose Canina (HC). Entre os vários hemoplasmas caninos identificados pertencentes à classe Mollicutes, distinguem-se *Mycoplasma haemocanis* e *Candidatus Mycoplasma haematoparvum*, anteriormente designados indiferenciadamente como *Haemobartonella canis* (Chalker, 2005; Compton *et al.*, 2012; Messick, Walker, Raphael, Berent & Xun Shi, 2002; Seixas, Alho, Guerra & Carvalho, 2011; Valle *et al.*, 2014).

Apesar da sua distribuição mundial (Compton *et al.*, 2012; Novacco *et al.*, 2010; Valle *et al.*, 2014) estudos realizados demonstraram que a carraça *Rhipicephalus sanguineus* é um vetor competente e indicam a sua importância como reservatório. Sendo esta carraça comum no sul da Europa e nos países da bacia do Mediterrâneo, é expectável também uma maior prevalência de infeções por *Mycoplasma* spp. nestas zonas de clima temperado, pelo que apresentam as maiores prevalências da Europa (Kenny, Shaw, Beugnet & Tasker, 2004; Messick & Harvey, 2012; Novacco *et al.*, 2010; Wengi *et al.*, 2008).

Estas bactérias infetam a superfície dos eritrócitos de vários mamíferos, apresentando-se como cocos, cadeias ou anéis que se dispõem na membrana celular dos eritrócitos (Messick & Harvey, 2012). *M. haemocanis* adquire a forma de pontuados basófilos arredondados, isolados ou em cadeia, com diâmetro variável entre 0,3 e 2,0 µm. *M. haematoparvum* tem dimensões inferiores (0,3 µm), afigurando-se como pontuados isoladamente ou emparelhados na superfície eritrocitária (Messick & Harvey, 2012; Seixas *et al.*, 2011; Sykes *et al.*, 2005; Valle *et al.*, 2014).

Estes hemoplasmas têm sido implicados em quadros de anemia hemolítica imunomediada de início abrupto, sendo esta a alteração clínico-patológica predominante nas infeções por *Mycoplasma* spp., principalmente em cães imunocomprometidos ou esplenectomizados (Chalker, 2005; Compton *et al.*, 2012; Messick & Harvey, 2012; Pitorri *et al.*, 2012).

Infeções crónicas podem agudizar em situações de imunodepressão provocadas por DCTV (Messick & Harvey, 2012; Roura *et al.*, 2010), nomeadamente em infeções por *Ehrlichia canis* (Inokuna *et al.*, 2006) e *Babesia canis* (Kraje, 2001).

Os fatores de risco associados ao aparecimento de infeção por hemoplasmas relacionam-se com o ambiente de canil (Kemming *et al.*, 2004; Novacco *et al.*, 2010), esplenectomia (Beaufils, 2012), imunossupressão, transfusões sanguíneas (Crawford *et al.*, 2013; Lester, Hume & Phipps, 1995; Syker *et al.*, 2004; Valle *et al.*, 2014), ingestão de sangue infetado (Sasaki, Ohta, Matsuu, Hirata, Ikadai & Oyamada, 2008), septicémia (Valle *et al.*, 2014) e outras doenças concomitantes (Syker *et al.*, 2004; Valle *et al.*, 2014; Wengi *et al.*, 2008)

Animais imunocompetentes mantêm-se geralmente assintomáticos com infeções crónicas e sub-clínicas por *Mycoplasma* spp. e não possuem sequer alterações hematológicas significativas (Compton *et al.*, 2012; Messick & Harvey, 2012; Valle *et al.*, 2014; Wengi *et al.*, 2008).

No diagnóstico, a realização de esfregaços sanguíneos tem-se revelado pouco sensível e específico nos animais assintomáticos (Beaufils, 2012; Pitorri *et al.*, 2012; Wengi *et al.*, 2008) aumentando a

sensibilidade em animais esplenectomizados com doença aguda (Messick & Harvey, 2012). A cultura e isolamento dos hemoplasmas caninos para diagnóstico não tem sido possível, sendo a técnica de PCR o método *gold standard* na detecção e identificação da bactéria em animais assintomáticos e sintomáticos (Barker *et al.*, 2010; Messick *et al.*, 2002; Messick & Harvey, 2012; Seixas *et al.*, 2011). *M. haemocanis* é resistente aos antibióticos beta-lactâmicos devido à sua estrutura mas sensível às tetraciclina e doxiciclina (Chalker, 2005), sendo o tratamento com doxiciclina o mais recomendado nas infecções por *Mycoplasma* spp. (Pitorri *et al.*, 2012; Messick & Harvey, 2012; Sykes *et al.*, 2004; Sykes *et al.*, 2005) embora a eliminação total da bactéria nem sempre seja possível (Chalker, 2005; Sykes *et al.*, 2004; Wengi *et al.*, 2008).

1.6 *Rickettsia conorii*

As Riquetsioses são provocadas por bactérias Gram-negativas cocóides ou pleomórficas, intracelulares obrigatórias. Estas pertencem à ordem Rickettsiales e família Rickettsiaceae (Taylor, Coop & Wall, 2007). Dentro desta família existe o género *Orientia* e *Rickettsia*. Por sua vez o género *Rickettsia* foi subdividido nas Riquetsioses propriamente ditas (*Spotted Fever Group*) e no Grupo Tifos (Greene, Kidd & Breitschwerdt, 2012). O grupo das Riquetsias pode encontrar-se classificado de acordo com o seu perfil fenotípico, incluindo quatro subgrupos: *Rickettsia rickettsii*; *R. massiliae*; *R. helevetica* e *R. akari*, cada um com várias subespécies também classificadas de acordo com o seu perfil fenotípico (Merhej, Angelakis, Socolovschi & Raoult, 2014).

No subgrupo *Rickettsia rickettsii*, a subespécie *Rickettsia conorii* destaca-se na medida em que é o principal agente da Febre Botonosa Canina (FBC), uma DCTV endémica na zona do Mediterrâneo com potencial zoonótico, podendo provocar a Febre Escaro Nodular (FEN), Febre da Carraça (nomenclatura também utilizada no cão), Febre Botonosa ou Febre Mediterrânica quando infeta o Homem. Segundo Chomel (2011), a doença é endémica na zona do Mediterrâneo e já é considerada re-emergente desde a sua descoberta.

Esta zoonose encontra-se na Europa, África e Índia (Greene *et al.*, 2012; Mencke, 2013). Portugal apresenta um clima semelhante ao da zona Mediterrânica e as condições ideais para a disseminação e manutenção deste agente nos seus vetores ixodídeos (Alexandre, Santos, Bacellar, Boinas, Nuncio & Sousa, 2011; Maia *et al.*, 2014).

O ixodídeo *Rhipicephalus sanguineus* é o principal vetor e considerado pela maioria dos autores como o hospedeiro reservatório desta infeção (Solano-Gallego *et al.*, 2015), sendo o cão um hospedeiro competente no ciclo doméstico. Contudo, estudos recentes permitiram concluir que o cão doméstico também é um hospedeiro reservatório (Alexandre *et al.*, 2011; Levin, Killmaster & Zemtsova, 2012; Levin, Zemtsova, Montgomery & Killmaster, 2014; Mencke, 2013; Solano-Gallego *et al.*, 2015). A infeção dos ixodídeos ocorre durante a ingestão de sangue de um hospedeiro com riquetsiemia, desde que fixado ao hospedeiro pelo menos 5 a 20 horas. A transmissão entre ixodídeos ocorre de forma transtadial, transovárica (Greene *et al.*, 2012) e durante *cofeeding* no hospedeiro (Brouqui, *et al.*,

2007; Zemtsova, Killmaster, Mumcuoglu & Levin, 2010). Desta forma o ixodídeo infeta vários hospedeiros mamíferos à medida que se alimenta em diferentes fases do seu desenvolvimento. Já no hospedeiro, a bactéria entra no organismo veiculada pela saliva dos ixodídeos infetados, e as riquetsias disseminam-se através do sistema circulatório, invadindo-o e multiplicando-se em células endoteliais de pequenas artérias e vénulas (Greene *et al.*, 2012). O tropismo das riquetsias para as células endoteliais induz lesão celular, resultando em vasculite, permeabilidade vascular alterada, edema e necrose (Breitschwerdt, 2005; Louro *et al.*, 2005). Esta infeção pode desenvolver doença aguda ou subclínica, com período de incubação entre 2 a 14 dias. À semelhança de outras riquetsioses, é caracterizada por sintomas na fase aguda: surgimento rápido de pirécia (entre 40 e 41°C), hiperestesia, edema periférico, eritema, linfadenomegália, taquicardia, rigidez postural, claudicação, edema conjuntival e desidratação. As alterações laboratoriais mais comuns são: anemia, neutrofilia com desvio à esquerda variável, trombocitopenia, hipoproteinémia, hipoalbuminémia e azotémia. Observa-se aumento na proteína C-reativa e aumento das enzimas hepáticas (Greene *et al.*, 2012; Solano-Gallego *et al.*, 2006).

O diagnóstico baseia-se nos achados do exame físico, anamnese e deve ser complementado com métodos serológicos e moleculares (Greene, Kidd & Breitschwerdt, 2012). O diagnóstico molecular por PCR permite confirmar a presença da bactéria antes da seroconversão (Kidd, Maggi, Diniz, Hegarty, Tucker & Breitschwerdt, 2008), assim como os métodos imunohistoquímicos (Greene *et al.*, 2012). Os anticorpos são produzidos sete a dez dias após o início dos sintomas, pelo que as técnicas serológicas poderão confirmar infeção após este período, através de IFI, ELISA e aglutinação em latex (Greene *et al.*, 2012). A terapêutica de eleição para o tratamento desta infeção são as tetraciclina, destacando-se a doxicilina e o cloranfenicol (Greene *et al.*, 2012). O tratamento com enrofloxacina (fluoroquinolona) provou ser eficaz com uma rápida melhoria clínica em animais sem sinais neurológicos ou lesão vascular evidente (Breitschwerdt, 2005). A terapia com doxiciclina e prednisolona em dose anti-inflamatória mostrou-se adequada ao manejo das manifestações oculares da doença (Breitschwerdt, Davidson, Hegarty, Papich & Grindem, 1997), e em dose imunossupressora revelou que o período de riquetsiemia prolonga-se mas reduz a pirexia e resulta na melhoria do estado geral. Apesar das evidentes diferenças na medicação, esta última opção não surtiu efeitos secundários negativos (Breitschwerdt *et al.*, 1997). A fluidoterapia deve ser instituída com precaução devido à lesão vascular observada no decurso da doença (Breitschwerdt, 2005).

A imunidade adquirida após infeção confere proteção numa reinfecção, resultando na diminuição da gravidade do quadro clínico (Greene *et al.*, 2012).

2. Agentes Etiológicos de Doenças Caninas Transmitidos por Culicídeos

2.1 *Acanthocheilonema reconditum*

É um nematode filarídeo que se encontra disseminado por toda a Europa cujo significado clínico é limitado (Brianti *et al.*, 2012). É transmitido por pulgas e piolhos, o seu ciclo biológico é semelhante ao de *D. immitis* com período pré-patente de 60 a 70 dias e as formas adultas localizam-se geralmente nos tecidos subcutâneos, fâscias musculares, rim e cavidade peritoneal (Magnis *et al.*, 2014; Ferasin & Knight, 2005). É uma espécie de filária não patogénica para o cão, no entanto interfere no diagnóstico diferencial de microfilarémia, detetada através da técnica de Knott, provocada por outros filarídeos como *D. immitis* (ESCCAP, 2012; Taylor; Coop & Wall, 2007), *D. repens* (Otranto *et al.*, 2013), *Acanthocheilonema dracunculoides* (Magnis *et al.*, 2014) e *Cercopithifilaria* sp. (Otranto *et al.*, 2011; Otranto *et al.*, 2012). *A. reconditum* tem sido reportada como um agente zoonótico na Europa (Huynh, Thean & Maini, 2001) no entanto, em zonas endémicas, o seu impacto na saúde pública não está ainda totalmente compreendido (Brianti *et al.*, 2012).

2.2 *Dirofilaria immitis*

As dirofilariose caninas são doenças parasitárias causadas por nemátodos filarídeos transmitidos por mosquitos, pulgas, piolhos e carraças, com crescente incidência em toda a Europa, alertando para o aumento do risco zoonótico na Saúde Pública (Alho *et al.*, 2014; Morchón, Carretón, González-Miguel & Mellado-Hernández, 2012; Rojas, Rojas, Montenegro & Baneth, 2015).

Os filarídeos com maior potencial patogénico são *Dirofilaria repens* e *Dirofilaria immitis*, ambos pertencem à superfamília Filarioidea e família Onchocercidae (Nelson, 2012; Otranto *et al.*, 2013) e são transmitidos por mosquitos do género *Aedes*, *Culex* e *Anopheles* (Alho *et al.*, 2014).

D. repens é uma filária do tecido subcutâneo, cuja infeção é geralmente assintomática e provoca ocasionalmente, no cão e no gato, nódulos não inflamatórios, prurido e erupções cutâneas (Magnis *et al.*, 2013). Este filarídeo tem surgido em diferentes países da Europa, Asia e África, como agente da dirofilariose humana e pode desenvolver um quadro clínico ligeiro a grave, com manifestações cutâneas, oculares e por vezes apresenta localizações ectópicas (Genchi, Genchi, Petry, Kruehwagen & Schaper, 2013; Nelson, 2012; Otranto *et al.*, 2013; Permi, Veena, Prasad, Kumar, Mohan & Shetty, 2011; Rinaldi, Cringoli, Venco & Genchi, 2013; Simón, López-Belmonte, Marcos-Atsutegi, Morchón & Martín-Pacho, 2005).

D. immitis é o filarídeo com o maior potencial patogénico, podendo comprometer a circulação e função pulmonares devido ao estabelecimento de formas juvenis e adultas na artéria pulmonar e eventualmente no coração direito, provocando insuficiência cardíaca direita. Também podem surgir localizações ectópicas no olho, SNC, cavidade abdominal e circulação sistémica (Alho *et al.*, 2014; Nelson, 2012).

Apesar do cão ser o hospedeiro definitivo de *Dirofilaria immitis*, o parasita já foi observado em mais de 30 espécies diferentes de mamíferos, incluindo o Homem (Bowman & Atkins, 2009; Nelson, 2012). O gato é considerado um hospedeiro acidental e, tal como as raposas, não é um bom hospedeiro reservatório (Bowman & Atkins, 2009; Otranto *et al.*, 2013).

Os adultos de *D. immitis* são longos e branco acinzentados, as fêmeas podem atingir 25 a 30 cm de comprimento e os machos 15 a 20cm, ambos com localização preferencial no sistema cardiovascular (Taylor, 2012).

Em Portugal podem ocorrer infeções concomitantes por filarídeos de menor potencial patogénico, desta forma é de importância diagnóstica e epidemiológica identificar as espécies de microfilárias, distinguindo diferentes espécies que não são patogénicas, tais como *Acanthocheyletonema reconditum* (anteriormente designada *Dipetalonema reconditum*), *A. dracunculoides* (Magnis *et al.*, 2014) e *Cercopithifilaria* sp (Otranto *et al.*, 2011), para que o plano terapêutico seja o mais adequado e específico possível (Alho *et al.*, 2014).

Na sua distribuição geográfica, *Dirofilaria immitis* e *Acanthocheyletonema reconditum* destacam-se pela elevada endemicidade no Velho e Novo Mundos. Em Portugal observou-se uma prevalência crescente ao longo dos últimos anos, tanto no cão como no gato, com elevadas prevalências na ilha da Madeira (Alho *et al.*, 2014; Morchón, Carretón, González-Miguel & Mellado-Hernández, 2012).

Na Europa, os vetores e hospedeiros intermediários de *Dirofilaria immitis* são mosquitos dos géneros *Culex*, *Aedes* e *Anopheles* (Cardoso *et al.*, 2012) mas outras espécies vão surgindo vindas de outros continentes como é o caso de *Aedes albopictus* (mosquito-tigre da Ásia) e *Aedes koreicus*, ambos vetores competentes na transmissão do parasita (AHS, 2014; ESCCAP, 2012; Montarsi *et al.*, 2015; Nelson, 2012; Otranto *et al.*, 2013). Em Portugal ainda não foi detetada a presença de *Aedes albopictus* (Núncio & Alves, 2014).

O ciclo de vida de *D. immitis* completa-se em cerca de sete a nove meses. As fêmeas do mosquito vetor são o hospedeiro intermediário pois ingerem microfilárias de um animal infetado e durante as seguintes duas a quatro semanas, conforme a temperatura e humidade ambientes, promovem o desenvolvimento das microfilárias L1 em L3 (a forma infetante), que serão inoculadas através da saliva ao hospedeiro seguinte, aquando da picada da fêmea. Sendo o dia zero o momento da inoculação, no dia três a larva infetante L3 evolui para L4 e inicia a sua migração através dos tecidos subcutâneos e musculares em direção ao tórax. Ao dia 50-70 a larva L4 sofre a muda final para jovem imaturo (ou forma juvenil L5), atravessa os músculos e atinge a circulação sanguínea, através da qual é levada até ao coração, podendo alojar-se na artéria pulmonar ao dia 70 após inoculação. Ao dia 120 praticamente todas as formas imaturas terão chegado à artéria pulmonar e estarão prestes a atingir a maturidade sexual. Ao fim de seis a sete meses (período pré-patente) surgirá a microfilarémia, completando-se o ciclo de *D. immitis* (Nelson, 2012). Os adultos podem viver até cinco ou sete anos e a microfilarémia pode subsistir até dois anos e meio (Bowman & Atkins, 2009).

A gravidade da doença está relacionada com: a duração da infecção, a quantidade de parasitas adultos, o tamanho, o nível de atividade e a resposta imunitária do hospedeiro à infecção (Nelson, 2012).

Associada à infecção por *D. immitis*, surge a bactéria Gram-negativa *Wolbachia pipiens* que estabelece uma relação de endossimbiose obrigatória com o parasita (Nelson, 2012). Estima-se que cerca de 100% da população de *D. immitis* hospede *Wolbachia pipiens* (Taylor; Bandi & Hoerauf, 2005). Esta bactéria é fundamental para a reprodução de *D. immitis* e manutenção de infecções crônicas, proporcionando imunotolerância do hospedeiro infetado. Por outro lado, aquando da morte de adultos ou larvas, a superfície desta bactéria liberta proteínas que despoletam uma atividade inflamatória significativa (Kramer & Genchi, 2014; Taylor & Hoerauf, 1999). Esta bactéria reside em vários tipos de artrópodes e filarídeos e a sua perpetuação nestes hospedeiros ocorre pela sua transmissão vertical e horizontal (Nelson, 2012).

A DC tem uma evolução crónica e os primeiros sinais clínicos podem surgir anos após a infecção e desenvolvem-se gradualmente. Um dos primeiros sinais costuma ser tosse crónica, seguida geralmente de dispneia moderada a grave, fraqueza e síncope após exercício ou excitação. A progressão da doença sem tratamento evolui para a insuficiência cardíaca congestiva direita, com edema abdominal (mais raramente dos membros) anorexia, perda de peso e desidratação (ESCCAP, 2012). Estima-se que 10 a 67% das infecções não demonstrem microfilarémia devido à resposta imunitária do hospedeiro que limita a presença das microfilárias à microcirculação pulmonar, resultando na formação de inflamação granulomatosa nos pulmões e pneumonia eosinofílica (Calvert & Ridge, 2006).

As alterações hematológicas mais comuns são a eosinofilia, basofilia, neutrofilia, anemia não regenerativa e trombocitopénia. As alterações bioquímicas mais comuns são o aumento das enzimas hepáticas e mais raramente das renais e hiperbilirrubinémia (Nelson, 2012). O síndrome nefrótico pode surgir devido ao depósito de imunocomplexos nos rins e diminuição da perfusão sanguínea, resultando em proteinúria, hipoalbuminémia, hipercolesterolémia e azotémia (Calvert & Ridge, 2006).

Em casos raros, ocorre o Síndrome da Veia Cava, aquando da presença ou morte (espontânea ou induzida) de uma grande quantidade de adultos e /ou microfilárias. Ocorre tromboembolismo pulmonar grave, muitas vezes relacionado com animais que tenham feito exercício físico intenso. Observa-se febre, dispneia aguda e hemoptise, com consequências frequentemente fatais para o hospedeiro (Bowman & Atkins, 2009; ESCCAP, 2012). Nas infecções maciças com 100 adultos ou mais, ou na presença da crescente resistência vascular pulmonar, observa-se a deslocação dos parasitas da artéria pulmonar para o coração direito e veia cava com consequente diminuição da função da válvula tricúspide e do débito cardíaco do coração direito. O mau funcionamento da tricúspide provoca turbulência no fluxo sanguíneo com rutura de eritrócitos e consequente hemólise aguda e hemoglobínúria (Calvert & Ridge, 2006). A diminuição do débito cardíaco origina sinais de congestão: veias jugulares distendidas, pulso jugular evidente, hepatomegália e ascite (Bowman & Atkins, 2009; Calvert & Ridge, 2006; Nelson, 2012). O recurso à radiografia de tórax e ecocardiografia são métodos complementares de diagnóstico que permitem avaliar a gravidade da

doença. A ecocardiografia permite inclusive confirmar a presença de dirofilárias no coração direito na suspeita de Síndrome da Veia Cava. (AHS, 2014; Bowman & Atkins, 2009).

A pesquisa de Ag baseia-se na detecção de uma proteína segregada exclusivamente pelas dirofilárias fêmeas adultas com mais de seis meses de idade. Este teste está disponível na técnica de imunocromatografia ou através de ELISA, pode produzir falsos negativos em caso de infecções com apenas duas ou três fêmeas; infecções mistas com fêmeas imaturas; infecções apenas com machos e em animais que receberam tratamento com lactonas macrocíclicas nove meses após a infecção (AHS, 2014). A detecção de microfilárias pode ser feita com recurso à técnica de Knott modificada e/ou observação de uma gota fresca de sangue capilar ao microscópio óptico (AHS, 2014). No entanto este último método é menos sensível em animais com microfilarémia inferior a 10 microfilárias por ml (Magnis *et al.*, 2013). A distinção das diferentes espécies de microfilárias pode ser realizada com recurso à técnica da fosfatase ácida, em que ocorrem padrões de coloração específica para cada espécie, aos padrões morfométricos e através de PCR (AHS, 2014; Magnis *et al.*, 2013; Roberts & Janovy, 2009).

A AHS (2014) recomenda o rastreio anual de infecção por *D. immitis* para a sua detecção precoce ou para a instituição de tratamento profilático, através da pesquisa de antígeno e de microfilárias em simultâneo. Dado que o ciclo de *D. immitis* dura em média sete a nove meses, não se recomenda a pesquisa de infecção em animais com menos de seis meses.

Um animal submetido a tratamento microfilaricida e adulticida, deve ser testado para pesquisa de antígeno e microfilárias após 6 meses e regularmente a cada 6 meses. Este considera-se livre de infecção quando dois testes de antígenos seguidos dão resultado negativo (AHS, 2014).

A AHS preconiza esquemas de tratamento com doxiciclina e lactonas macrocíclicas um a dois meses antes do tratamento adulticida. A doxiciclina demonstrou ter efeitos no ciclo de vida de *Dirofilaria* spp., reduz a quantidade de dirofilárias com *Wolbachia* em todas as fases (larvas e adultas) e diminui significativamente os seus metabolitos e o efeito tóxico desta bactéria no decorrer do tratamento (Kramer & Guenchi, 2014). Ao eliminar a bactéria *Wolbachia*, as fêmeas de *D. immitis* vêm a sua reprodução inibida e torna-se possível bloquear a transmissão de estirpes resistentes (Kramer & Guenchi, 2014; Taylor & Hoerauf, 2013) e simultaneamente diminuir a circulação de antígeno com diminuição da resposta imunitária do hospedeiro (Kramer *et al.*, 2011).

As lactonas macrocíclicas (ivermectina, milbemicina, moxidectina e selamectina) são eficazes na terapia microfilaricida, na prevenção da doença e no tratamento adulticida. Devem ser administradas com muita precaução em animais com suspeita de elevada microfilarémia (Nelson, 2012). Aconselha-se a sua administração desde o diagnóstico e mantida durante toda a vida em zonas endémicas (AHS, 2014). Nos adulticidas, destaca-se a melarsomina como o fármaco de eleição para a eliminação dos adultos, no entanto não tem atividade contra dirofilárias com menos de quatro meses (AHS, 2014; Bowman & Atkins, 2009; Calvert & Ridge, 2006; Nelson, 2012). A AHS (2014) descreve o protocolo com 3 administrações de melarsomina como o mais seguro e eficaz, eliminando cerca de 98% dos

adultos. Estudos com cães infetados experimental e naturalmente apontam para ótimos resultados na redução das infeções de adultos (até 80%) com a associação doxiciclina e ivermectina antes do tratamento adulticida (Kramer & Guenchi, 2014; McCall *et al*, 2008) ou só com doxiciclina seguida do tratamento adulticida onde se observam alterações pulmonares e arteriais mínimas (Kramer & Guenchi, 2014). Esta associação está indicada quando o tratamento adulticida com melarsomina não é possível ou está contraindicado (AHS, 2014).

Tendo em conta a fisiopatologia da dirofilariose canina, é inevitável que o tratamento da dirofilariose promova alterações pulmonares inflamatórias e por vezes tromboembolismo pulmonar (Kramer *et al*, 2011). Os sinais de tromboembolismo podem surgir 7 a 10 dias ou mesmo 4 semanas após o tratamento. É essencial manter o animal em tratamento com restrição de exercício. No decorrer do tratamento adulticida é importante instituir terapia complementar no maneio de efeitos secundários no decorrer de eventual tromboembolismo. Glucocorticóides e heparina são os fármacos mais utilizados (AHS, 2014; ESCCAP, 2012; Atkins, 2005). Na evidência de Síndrome da Veia Cava, a intervenção é urgente e passa pela remoção cirúrgica das dirofilárias adultas (AHS, 2014; Calvert & Ridge, 2006).

Em zonas de clima temperado na Europa, a prevenção deve acontecer entre os meses de maio e novembro (ESCCAP, 2012).

As lactonas macrocíclicas utilizadas na profilaxia são as mesmas utilizadas na terapia microfilaricida (Nelson, 2012; AHS, 2014; Bowman & Mannella, 2011). Estas eliminam microfilárias, larvas L3 e L4 assim como também participam na eliminação de alguns adultos em terapia prolongada (AHS, 2014). Apesar da elevada eficácia destes compostos, já estão reportadas falhas de proteção e desenvolvimento de resistências (Bourguinat *et al.*, 2015; AHS, 2014).

A administração de moxidectina injetável de libertação lenta demonstrou bons resultados no controlo de infeção por *D. repens* e *D. immitis* durante seis meses (AHS, 2014; Otranto *et al.*, 2013; Watier-Grillot, Marié, Cabre & Davoust, 2011).

A combinação de lactonas macrocíclicas com produtos repelentes contra mosquitos durante a época de maior atividade dos vetores é útil na proteção dos cães afim de evitar ectoparasitas e infeção (ESCCAP, 2012).

Apesar das dirofilarioses representarem uma preocupação na Saúde Pública, a taxa de infeção em humanos é considerada baixa (Nelson, 2012). Entre as zoonoses por filárias, *D. immitis* e *D. repens* são as mais frequentes, com localização em tecidos subcutâneos, vasos pulmonares, testículos e sistema nervoso central, com manifestações assintomáticas a graves ou fatais. Apesar do parasita não completar o seu ciclo de vida no Homem, as infeções por *Dirofilaria* spp. podem induzir granulomas parasitários pulmonares e outros nódulos semelhantes a neoplasias, constituindo um desafio no seu diagnóstico (Otranto *et al.*, 2013; Miró *et al.*, 2013).

3. Agentes Etiológicos de Doenças Caninas Transmitidos por Flebótomos

3.1 *Leishmania infantum*

A Leishmaniose Canina (LCan) é uma doença parasitária provocada por protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e género *Leishmania* cujos vetores biológicos são insetos do género *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomya* no Novo Mundo (Baneth & Solano-Gallego, 2012). Entre as várias espécies de *Leishmania* spp. que infetam mamíferos e humanos, a mais importante é *Leishmania infantum* (ou *Leishmania chagasi*) pois representa uma zoonose emergente a nível mundial transmitida por insetos (Dantas-Torres, Solano-Gallego, Baneth, Ribeiro, Paiva-Cavalcanti & Otranto, 2012; Pennisi, 2015). A World Health Organization (WHO) enumera quatro tipos de leishmaniose humana: cutânea, cutânea difusa, mucocutânea e visceral (também designada *kala azar*). Este parasita intracelular obrigatório invade células específicas, como macrófagos ou células dendríticas e origina a libertação de mediadores que vão participar na ativação da resposta imunitária e desenvolvimento de doença sistémica (Freitas & Pinheiro, 2010; Sherding, 2006).

A LCan é endémica nos países da bacia do Mediterrâneo e outros países do sul da Europa, Continente Americano e Ásia, no entanto novos dados indicam a sua disseminação e a dos seus vetores em direção ao norte da Europa (Baneth *et al.*, 2008; Bourdeau *et al.*, 2014; Gramiccia, 2011; Miró *et al.*, 2013; Noli & Saridomichelakis, 2014; Pennisi, 2015). Isto verifica-se devido às alterações climáticas mas também por causa da globalização e do grande movimento de animais de zonas endémicas para zonas não endémicas (Bourdeau *et al.*, 2014; Pennisi, 2015). De acordo com Moreno e Alvar (2002) estima-se que pelo menos 2,5 milhões de cães no sul da Europa estejam infetados com LCan.

Em Portugal, o agente da *Leishmania infantum* possui várias estirpes de zimodemes, sendo a mais comum a MON-1 (Baptista-Fernandes, Marques, Rodrigues & Santos-Gomes, 2007).

O Observatório Nacional das Leishmanioses registou um aumento da LCan nas zonas Centro e Sul entre 1981 e 2003. Esta aumentou de 5,2% para 19,2% em Lisboa e 7,8% para 21,3% na zona de Setúbal, sendo estas as zonas com maior prevalência em Portugal.

Nas zonas endémicas da Europa, o hospedeiro reservatório de maior relevância é o cão doméstico pela sua elevada suscetibilidade à doença e o seu contato estreito com o Homem, no entanto outros animais têm sido indicados como possíveis reservatórios do parasita, tais como gatos (Gomes, 2015) e lagomorfos (Gramiccia, 2011; Pennisi, 2015). Infeções acidentais por *L. infantum* já foram descritas em equinos domésticos na Europa (Gramiccia, 2015).

No Velho Mundo (Europa, Ásia e África), os vetores deste parasita são insetos da ordem Diptera, família Psychodidae, sub-família Phlebotominae e género *Phlebotomus*, daí a sua denominação de insetos flebótomos (Roberts & Janovy, 2009). Em Portugal, os flebótomos predominantes na disseminação da LCan são os insetos das espécies *Phlebotomus perniciosus* e *Phlebotomus ariasi* (Afonso & Alves-Pires, 2008; Campino *et al.*, 2006; Oliveira, Diaz, Santos, Bourdeau & Fonseca, 2007). A altura de maior atividade dos flebótomos acontece entre os meses de maio a outubro, às horas

crepusculares e durante a noite (ESCCAP, 2012). A presença destes insetos concentra-se em zonas de microclima húmido e sombrio, com locais estreitos para a nidificação das fêmeas (frestas, raízes de árvores, pedaços de folhas molhadas, vasos partidos, etc.). A participação de outros vetores biológicos (pugas e carraças) na transmissão e manutenção da leishmaniose em zonas endémicas tem sido discutida por vários autores, mas não foi possível até agora provar e confirmar a infeção de cães através destes vetores (Coutinho & Linardi, 2007; Dantas-Torres, 2011; Ferreira, Fattori, Souza & Lima, 2009; Solano-Gallego, 2012).

A transmissão direta entre cães é uma hipótese proposta na tentativa de explicar o aparecimento de casos de LCan em zonas cuja presença dos vetores não se observa, no entanto o seu significado epidemiológico não é, para já, relevante (Gaskin *et al.*, 2002; Gramiccia, 2011). A transmissão vertical de mãe para filhos (Slimane *et al.*, 2014) e através de transfusões sanguíneas já foi descrita (Baneth *et al.*, 2008; Taylor, 2007), assim como a transmissão venérea (Silva, Oliveira, Silva, Xavier, Nascimento & Santos, 2009).

O ciclo de vida da leishmania é heteroxeno, uma parte do ciclo ocorre no vetor invertebrado e outra parte ocorre no hospedeiro vertebrado (Roberts & Janovy, 2009). Ao longo deste ciclo é possível observar duas formas parasitárias principais: a forma amastigota (intracelular e aflagelada) que parasita os macrófagos e outras células do sistema reticuloendotelial presentes na pele, fígado, baço, medula óssea, linfonodos e mucosa do hospedeiro vertebrado; e a forma promastigota (extracelular e flagelada) presente no inseto vetor (Taylor *et al.*, 2007; Tomás & Romão, 2008). As fêmeas do género *Phlebotomus* alimentam-se de animais infetados, ingerindo formas promastigotas que se desenvolvem em formas amastigotas no intestino médio, migram para as peças bucais e infetam um novo hospedeiro aquando de nova alimentação (Baneth *et al.*, 2008; Bourdeau *et al.*, 2014; Gramiccia, 2011; Miró *et al.*, 2013). Após a entrada no hospedeiro, as formas amastigotas são interiorizadas pelos macrófagos, sofrem diferenciação para formas promastigotas e multiplicam-se. Após esta transformação são libertados pela célula (por lise ou exocitose) e iniciam a sua disseminação pelo organismo, promovendo doença sistémica (ESCCAP, 2012; Sherding, 2006). No cão torna-se impossível a tarefa de distinguir cada forma clínica da doença devido ao vasto leque de sinais clínicos, considerando-se a forma viscerocutânea como a mais predominante (Tomás & Romão, 2008). O tipo de resposta imunitária que o hospedeiro desencadeia influencia a progressão da doença. A imunidade celular permite a proliferação de linfócitos T e o controlo da doença, desencadeando uma imunidade protetora e apesar de infetado, o animal permanece assintomático ou subclínico. Quando a imunidade celular falha no controlo da infeção, há depleção de linfócitos T e é estimulada a imunidade humoral. Esta é uma resposta não protetora que desencadeia a produção de linfócitos B e surge assim um nível elevado de Ac anti-leishmania, levando a uma reação inflamatória sistémica devido à deposição de imunocomplexos em diferentes órgãos e tecidos com degradação do estado geral e manifestação de sinais clínicos (Baneth *et al.*, 2008; Diaz *et al.*, 2012; Santos-Gomes *et al.*, 2008).

Alguns estudos têm permitido considerar que existe uma suscetibilidade acrescida de algumas raças em relação a outras, com base numa eficaz resposta imunitária celular das raças mais resistentes (Solano-Gallego *et al.*, 2000). Excluindo a resistência do foro genético, fatores como o estado nutricional, infeções concomitantes, outros parasitas e contato prévio com a LCan também modelam a suscetibilidade do animal à doença (Baneth *et al.*, 2008), assim como o tipo de estirpe e virulência do parasita (Baptista-Fernandes *et al.*, 2007). Alguns cães desenvolvem um quadro subclínico e crónico da doença, podendo passar meses a anos até surgirem sinais clínicos, muitas vezes associados a situações de imunossupressão e/ou doenças concomitantes (Oliveira *et al.*, 2007; Sherding, 2006; Solano-Gallego, 2011). A LCan apresenta uma grande variedade de sinais clínicos, a maioria inespecíficos, no entanto são determinados pela resposta imunitária montada pelo hospedeiro (Baneth & Aroch, 2008). A gravidade do quadro clínico está relacionada com a deposição de imunocomplexos nos diferentes órgãos e tecidos e na grande proliferação de macrófagos infetados pelas formas amastigotas (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

As manifestações clínicas mais frequentes dos animais sintomáticos são lesões cutâneas, linfadenomegália, fraca condição corporal e atrofia muscular generalizada, desenvolvimento de insuficiência renal aguda, onicogrifose, esplenomegália e hepatomegália, claudicação por poliartrites e nevralgias, lesões oculares, epistáxis e alterações primárias da hemostase. Mais raramente observa-se pirécia intermitente, vômito e/ou diarreia e sinais neurológicos (Baneth *et al.*, 2008; Bourdeau *et al.*, 2014; ESCCAP, 2012; Jüttner, Sánchez, Landeras, Slappendel & Arnold, 2001; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008; Sherding, 2006; Taylor, 2007). A insuficiência renal está presente na maioria dos animais infetados, inclusive assintomáticos, sendo uma das principais causas de morte na LCan (Costa *et al.*, 2004).

A nível laboratorial observa-se aumento das enzimas hepáticas, hiperproteinémia e hipoalbuminémia com diminuição do rácio albumina/globulina. O proteinograma revela muitas vezes hiperglobulinémia e hipergamaglobulinémia, e apesar desta não ser patognomónica da LCan, está presente em 80% dos cães doentes (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). Observam-se diferentes graus de anemia em quase todos os animais sintomáticos, geralmente normocítica e normocrómica (não regenerativa), leucocitose ou leucopénia e menos frequentemente trombocitopénia ou trombocitopatia (Baneth *et al.*, 2008; ESCCAP, 2012; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008; Solano-Gallego, 2011).

Consoante a necessidade do diagnóstico assim se determinam os exames laboratoriais mais adequados (Gomes, Cavalcanti, Lira, Abath & Alves, 2008; Miró, Cardoso, Pennisi, Oliva & Baneth, 2008). O diagnóstico da LCan por vezes é complexo e integra várias informações: a história clínica e epidemiológica do animal, exame físico, alterações hematológicas, bioquímicas, proteinograma e evidências histopatológicas assim como os resultados de métodos de diagnóstico parasitológicos, moleculares e serológicos (Bourdeau *et al.*, 2014; Gramiccia, 2011; Noli & Saridomichelakis, 2014; Solano-Gallego *et al.*, 2009). O esquema de diagnóstico deve ser adaptado a cada animal,

considerando a hipótese de que muitas vezes existem coinfeções com outras DCTV (Solano-Gallego, 2011), sendo as mais frequentes a erliquiose, dirofilariose e babesiose caninas (Bourdeau *et al.*, 2014). A observação microscópica de formas amastigotas em citologias de diferentes tecidos (lesões cutâneas e linfonodos, medula óssea, baço e fígado) e líquidos biológicos (líquido sinovial e/ou líquido cefalorraquidiano) permite confirmar o diagnóstico. Esta técnica é muito específica (100%) mas pouco sensível na fase inicial/assintomática da doença ou durante o tratamento (Santos-Gomes *et al.*, 2008; Gramiccia, 2011; Miró *et al.*, 2008; Noli & Saridomichelakis, 2014; Solano-Gallego, 2011).

O diagnóstico serológico proporciona resultados mais conclusivos nos animais sintomáticos, altura em que estes possuem maior concentração de Ac anti-leishmania em circulação (Reis *et al.*, 2006). A seropositividade ocorre, em média, cinco meses após a infeção (Gramiccia, 2011; Oliva *et al.*, 2006). Existem vários métodos disponíveis: ELISA, IFI, Teste de Aglutinação Direta, Western Blotting / Reação de Montenegro ou Reação de Hipersensibilidade Retardada e testes serológicos rápidos baseados em imunocromatografia, com resultados qualitativos céleres *in-house* mas que necessitam de confirmação laboratorial por métodos serológicos quantitativos (Santos-Gomes *et al.*, 2008; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2011). O teste ELISA pode ser realizado com dois conjugados na deteção dos complexos antígeno-anticorpo: o Ac anti-IgG e a proteína A, permitindo este último uma maior sensibilidade e especificidade (Gomes, 2015).

Atualmente destaca-se a deteção por qPCR, que permite amplificar e quantificar níveis muito baixos de ADN do parasita em diferentes amostras de tecidos e sangue. Tem elevada especificidade e sensibilidade (Reis *et al.*, 2013) mas não permite concluir acerca da gravidade da doença (Santos-Gomes *et al.*, 2008; Gramiccia, 2011; Miró *et al.*, 2008; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008; Solano-Gallego, 2011). A aplicabilidade do qPCR em zangaratoas conjuntivais demonstrou-se bastante útil como forma de diagnóstico com recurso a técnicas minimamente invasivas (Ceccarelli, Galluzzi, Sisti, Bianchi & Magnani, 2014; Lombardo, Pennisi, Lupo, Migliazzo, Caprí & Solano-Gallego, 2012).

O tratamento da LCan permite o controlo dos sinais clínicos e, em alguns casos, a cura clínica com consequente diminuição da carga parasitária e redução do risco de transmissão do parasita ao vetor (Noli & Saridomichelakis, 2014; Otranto & Dantas-Torres, 2013), no entanto é difícil eliminar totalmente a infeção do hospedeiro (Noli & Saridomichelakis, 2014; Solano-Gallego *et al.*, 2009, 2011). Doentes com insuficiência renal tendem a ter um prognóstico mais reservado (Roura *et al.*, 2013; Miró *et al.*, 2008). Na Europa atualmente preconizam-se vários protocolos com recurso aos seguintes fármacos: antimoniato de meglumina; miltefosina; alopurinol e anfotericina B (Bianciardi *et al.*, 2009; Meireles, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2011). A anfotericina B é a primeira escolha no tratamento da LVH e a WHO não recomenda o seu uso em Medicina Veterinária (Miró *et al.*, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2009, 2011). A associação mais utilizada e com elevado sucesso terapêutico é o antimoniato de meglumina com alopurinol, seguida de miltefosina mais alopurinol. Em casos com sintomatologia mais branda, o alopurinol em monoterapia produz bons resultados (Bourdeau *et al.*,

2014; Pennisi, 2015; Solano-Gallego *et al.*, 2011). Nos quadros clínicos com sinais associados à deposição de imunocomplexos (poliartrites e uveítes), pode ser administrada prednisona ou prednisolona (Meireles, 2008).

Na Europa está disponível um medicamento imunomodulador para prevenção e tratamento da LCan. A domperidona (Leisguard®) é um composto que estimula a imunidade celular e está aconselhado na prevenção aquando da deslocação do animal para zonas endémicas (Gómez-Ochoa, Castillo, Gascón, Zarate, Alvarez & Couto, 2009; Sabaté, Llinás, Homedes, Sust & Ferrer, 2014). Outros fármacos: aminosidina; pentamidina; metronidazol combinado com espiramicina ou enrofloxacin, e cetoconazole, são considerados opções alternativas, alguns com efeitos tóxicos relevantes e outros carecendo de estudos clínicos a comprovar a sua eficácia e segurança (Baneth & Solano-Gallego, 2012; Meireles, 2008).

Alguns autores defendem a realização de testes serológicos seis meses após o início do tratamento (Solano-Gallego *et al.*, 2009). A técnica de qPCR permite monitorizar a redução da carga parasitária na resposta do animal ao tratamento (Santos-Gomes *et al.*, 2008; Gramiccia, 2011; Miró *et al.*, 2008; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008; Solano-Gallego, 2011).

Aproximadamente 75% dos cães infetados e sem evidência de lesão renal, vivem mais de quatro anos após o tratamento adequado (Roura *et al.*, 2013). Já Meireles (2008) concluiu que 75% dos animais sofrem recidivas no ano seguinte ao diagnóstico e requerem repetição dos tratamentos e com maior frequência.

A proteção dos cães infetados contra novas picadas dos insetos é relevante, visto que a taxa de infeção para os vetores é maior nos animais sintomáticos do que nos assintomáticos e a reinfeção é possível, segundo Soares, Mendonça, Bonfim, Rodrigues, Werneck & Costa (2011). Três meses após a deslocação a uma zona endémica, aconselha-se realizar a pesquisa de infeção por *Leishmania infantum* em animais que vivem em zonas não endémicas (Solano-Gallego, 2011).

Existem atualmente quatro vacinas disponíveis no Brasil (Leishmune®; LeishTec®; LiESAp®; Leishvacin®) e uma na Europa (CaniLeish®) (Dantas-Torres *et al.*, 2012b; Palatnik-de-Sousa, 2012). Segundo Gradoni (2015) apenas duas destas vacinas demonstraram conferir proteção significativa e foram licenciadas como vacinas para canídeos, a Leishmune® e a CaniLeish®. A vacina disponível na Europa está preconizada para a proteção individual do animal, em animais seronegativos e com idade superior a 6 meses, com eficácia estimada entre os 68,4% e 92,7%. Esta vacina leva à produção de Ac vacinais anti-*Leishmania* detetáveis por métodos serológicos (Otranto & Dantas-Torres, 2013; Pennisi, 2015). Em estudos preliminares feitos por Bongiorno *et al.* (2013), após a vacinação de cães infetados por LCan, observou-se uma diminuição significativa na infeção dos flebótomos, revelando uma mais-valia das vacinas no tratamento de animais infetados.

A vacinação pode ser combinada com a proteção individual dos cães com piretróides, como parte de uma abordagem integrada na prevenção da LCan (Pennisi, 2015).

Existem medidas de prevenção para diminuir o contato dos cães com os flebótomos. Evitar passear às horas crepusculares durante a época de maior atividade dos vetores (maio a outubro), evitar a permanência dos animais na rua durante a noite; destruição de micro habitats para os vetores (pilhas de lenha ou pedras, frestas, solos húmidos, matéria em decomposição, etc.) e aplicação de inseticidas no interior das casas (Meireles, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2011).

É de extrema importância manter um regime apertado de proteção de cães infetados, de modo a diminuir ao máximo as picadas dos insetos e o risco de infeção de outros cohabitantes (Gramiccia, 2011).

Do ponto de vista da Saúde Pública, segundo a WHO a LVH é endémica em 88 países, dos quais 72 em desenvolvimento, e 90% da LVH encontra-se no Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão. Uma das maiores preocupações da WHO no controlo da LVH em zonas endémicas relaciona-se com os indivíduos HIV positivos. Em adultos saudáveis a infeção mantém-se assintomática, já nos doentes com HIV a *Leishmania* age de forma oportunista, estimando-se que cerca de 70% dos adultos infetados no sul da Europa sejam HIV positivos. Excluindo este grupo de risco, esta doença observa-se maioritariamente em crianças e doentes imunodeprimidos (Cardoso *et al.*, 2012). Segundo Tomás & Romão (2008), a importância do cão como hospedeiro reservatório no cenário da Saúde Pública relaciona-se com os seguintes fatos: a LCan é uma doença crónica e o animal mantém-se como fonte de infeção para o vetor; a presença do parasita na pele proporciona fácil acesso ao inseto vetor; o cão é a principal fonte de alimentação para o inseto vetor; há uma elevada prevalência da LCan no cão e existe uma relação estreita entre o Homem e o canídeo doméstico. Um estudo realizado por Fonseca (2009) permitiu concluir que a posse ou coabitação com um cão com LCan não é um fator de risco para que o ser humano contraia a infeção. Embora a maioria dos animais infetados não desenvolva sinais clínicos, continuam a ser uma fonte de infeção para os insetos vetores (Cardoso *et al.*, 2012). No geral, a LCan e a LVH carecem de dados atualizados e completos, visto que em países cuja notificação é obrigatória nem sempre tal se verifica e os dados que existem, provenientes de várias entidades existentes, não são concordantes (Dujardin *et al.*, 2008).

4. Profilaxia de doenças caninas transmitidas por vetores

O controlo de DCTV implica o controlo dos vetores de forma a evitar a interação vetor-hospedeiro. A escolha do melhor produto está relacionada com as condições em que os animais vivem, as atividades em que estes se envolvem e as possíveis deslocções a zonas endémicas ou não endémicas (Mencke, 2013). Além da proteção individual dos animais, o controlo ambiental dos vetores também deve ser tido em consideração (Otranto & Dantas-Torres, 2013).

A frequência da aplicação de produtos depende do grau de infestação pelos vetores e da duração dos efeitos residuais dos princípios ativos, devendo sempre ser respeitadas as indicações do fabricante (Dantas-Torres, 2008).

Existem vários produtos veterinários registrados, dotados de ação repelente e acaricida, com diferentes composições, aplicados sob a forma de pó, pulverização (*spray*), unção punctiforme (*spot-on*), unção contínua (*pour-on*) e coleiras impregnadas (Horak, Fourie & Stanneck, 2012; Solano-Gallego & Baneth, 2011; Solano-Gallego *et al.*, 2011).

As alterações climáticas observadas nas últimas décadas levaram à ausência de sazonalidade dos vetores artrópodes. Desta forma, torna-se aconselhável a aplicação de medidas profiláticas o ano inteiro. Os produtos de largo espectro e mais duradouros têm sido uma aposta por parte da indústria farmacêutica e dos Médicos Veterinários para compensar a complacência observada por parte dos donos na aplicação de medidas profiláticas (ESCCAP, 2015; Mencke, 2013).

Dentro das unções punctiformes existem diferentes fórmulas disponíveis.

A associação de fipronil (6,1%) e permetrina (54,4%) (EFFITIX®) tem um efeito acaricida importante nas espécies *R. sanguineus* e *I. ricinus*, com elevada eficácia no bloqueio da infeção por *B. canis*, através do efeito repelente significativo em carraças *Dermacentor reticulatus* (Navarro, Reymond, Fourie, Hellmann & Bonneau, 2015).

Uma diferente composição na associação de 6,76% fipronil e 50,48% permetrina (FRONTLINE TRI-ACT®/ FRONTACT®) proporciona uma ação repelente e inseticida importante em espécies de mosquitos que transmitem *Dirofilaria* spp., durante pelo menos quatro semanas (Fankhauser *et al.*, 2015).

Esta associação (fipronil e permetrina) contribui para a prevenção das principais DCTV observadas na Europa (Cardoso, 2015).

Outra associação, com 10% imidaclopride e 50% permetrina (ADVANTIX®), aplicada mensalmente ou a cada duas semanas atinge eficácias de 88,9% e 100%, respetivamente, na prevenção da LCan em zonas endémicas (Otranto *et al.*, 2007) e eficácia acima dos 90% na prevenção de DCTV também em zonas endémicas (Otranto *et al.*, 2010a). Aconselha-se no entanto a aplicação desta unção punctiforme a cada três a quatro semanas, com redução das picadas de insetos e mosquitos em cerca de 90% (Miró, Gálvez, Mateo, Montoya, Descalzo & Molina, 2007). Em zonas altamente endémicas, como a Itália, e na ausência de medidas de controlo de vetores durante três épocas de transmissão, a infeção por *Leishmania infantum* pode ascender a 100% (Oliva *et al.*, 2006).

Um produto recente, o piriprol a 12,5% (PRAC-TIC®), demonstrou manter a eficácia perto dos 100% contra *R. sanguineus* e *Ctenocephalides felis*, durante 30 dias, mesmo após lavagens frequentes com xampu (Schuele *et al.*, 2008).

A combinação com amitraz e metaflumizona (PROMERIS-DUO®), também revelou boa eficácia contra as carraças mais comumente encontradas em cães, incluindo *R. sanguineus* (Rugg, Hair, Everett, Cunningham & Carter, 2007).

Nos últimos anos surgiram novas moléculas no combate aos ectoparasitas, disponíveis em comprimidos para administração oral.

O composto afoxolaner (NEXTGARD®) demonstrou uma eficácia perto dos 100% no controlo de infestações por pulgas e carraças dos géneros *Ixodes*, *Dermacentor* e *Rhipicephalus*, interrompendo a transmissão de agentes patogénicos entre animais infetados (Beugnet *et al.*, 2014; Dumont, Blair, Fourie, Chester & Larsen, 2014; Kunkle, Daly, Dumont, Drag & Larsen, 2014; Letendre *et al.*, 2014; Shoop *et al.*, 2014). Além da sua eficácia acaricida contra as principais espécies de ixodídeos distribuídas pela Europa, previne reinfestações durante os 28 dias seguintes ao tratamento (Halos, Lebon, Chalvet-Monfray, Larsen & Beugnet, 2014).

O composto fluralaner (BRAVECTO®), também em comprimidos, é um potente acaricida e inseticida e demonstrou eficácia contra pulgas e carraças durante 12 semanas após uma única administração oral (Rohdich, Roepke & Zschiesche, 2014).

Outras apresentações como coleiras impregnadas com 10% de imidaclopride e 4,5% de flumetrina (SERESTO®) são um dos produtos com a ação mais duradoura, estimada em oito meses. Estas demonstraram uma eficaz ação antiparasitária para pulgas e carraças (Dantas-Torres *et al.*, 2013; Stanneck *et al.*, 2012a; Stanneck *et al.*, 2012b) e contra as picadas de insetos e mosquitos, com uma elevada eficácia (perto dos 100%) (Otranto & Dantas-Torres, 2013; Otranto *et al.*, 2013). Já as coleiras impregnadas com 4% deltametrina (SCALIBOR®), renovadas a cada cinco a seis meses, demonstraram uma proteção a rondar os 90% contra as picadas de insetos flebótomos (Manzillo, Oliva, Pagano, Manna, Maroli & Gradoni, 2006; Otranto & Dantas-Torres, 2013; Solano-Gallego *et al.*, 2011).

O uso concomitante de coleira impregnada com deltametrina (SCALIBOR®) e a administração de um comprimido de fluralaner (BRAVECTO®) na prevenção de ectoparasitas é bem tolerado e proporciona uma excelente proteção individual (Walther, Fisara, Allan, Roepke & Nuernb, 2014).

Apesar da eficácia dos produtos mencionados, considera-se pertinente a inspeção diária dos animais para pesquisa de ectoparasitas e a sua remoção imediata (Dantas-Torres, 2008; Roupakias, Mitsakou & Al Nimer, 2011; Sherding, 2006).

A remoção dos ixodídeos deve ser realizada o mais rapidamente possível dado que o risco de transmissão de infeções aumenta significativamente com o tempo de fixação.

Embora não exista um consenso acerca da melhor forma de remover as carraças, qualquer que seja o método utilizado, deve-se evitar o esmagamento da carraça, podendo esta regurgitar através da zona de fixação e aumentar o risco de transmissão de doenças. A maioria dos métodos recomendam a extração manual com pinças apropriadas, em que se seguram as peças bucais da carraça o mais perto possível da pele, puxando gentil, firme e continuamente, até se observar o destacamento da carraça intacta (Roupakias *et al.*, 2011).

Em zonas endémicas o tratamento de cadelas antes da reprodução com ectoparasiticidas é aconselhável para prevenir infeções congénitas provocadas por agentes de DCTV (Baneth, 2012).

Capítulo IV – Infecção por Agentes de Doenças Caninas Transmitidos por Vetores em cães de caça no concelho de Loures

1. OBJETIVOS

1. Rastreio de infecção por agentes de DCTV (*Anaplasma* spp.; *Babesia* spp.; *Dirofilaria immitis*; *Ehrlichia canis*; *Hepatozoon canis*; *Leishmania infantum*; *Mycoplasma* spp.; microfilárias; e *Rickettsia conorii*) em cães de caça que residiam no concelho de Loures;
2. Obtenção de informação sobre os animais junto dos proprietários;
3. Análise estatística para avaliar a possível correlação entre as infeções detetadas e a profilaxia aplicada, o alojamento, o meio ambiente e as características físicas dos cães.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização da amostra

A amostra presente neste estudo foram 60 cães de caça que viviam, treinavam e caçavam predominantemente no concelho de Loures. Foi recolhida informação em folhas de registo (Anexo III) no dia de cada recolha, sobre a vacinação, a desparasitação, o tipo de pelagem, a alimentação, os locais de habitação e o meio envolvente, a presença e/ou ausência de alterações físicas e/ou comportamentais dos cães, observadas pelos donos.

As técnicas de diagnóstico utilizadas foram: esfregaço sanguíneo para pesquisa de inclusões parasitárias nas células em circulação; técnica modificada de Knott para pesquisa de microfilárias e posterior pesquisa de antígeno de *Dirofilaria immitis* com recurso a imunocromatografia; IFI para a deteção de anticorpos: anti-*Anaplasma phagocytophilum*, anti-*Ehrlichia canis*, anti-*Leishmania infantum* e anti-*Rickettsia conorii*, e ELISA para a deteção de anticorpos anti-*Babesia* spp..

Após a recolha desta informação procedeu-se à identificação das coinfeções mais comuns e fatores condicionantes.

2.2 Colheita de amostras e processamento

As colheitas foram realizadas entre fevereiro e julho de 2014, no decorrer da deslocação aos canis onde os animais habitavam.

Recolheu-se entre 2,5 ml e 3 ml de sangue venoso da veia cefálica a cada animal. Do sangue recolhido, 1 ml foi acondicionado em tubo com EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e os restantes ml em tubo seco.

Do tubo com EDTA foi retirada uma gota de sangue para realização de dois esfregaços por cada animal e o restante para executar a técnica de Knott modificada. O sangue em tubo seco foi centrifugado durante 10 minutos à velocidade de 5000 rpm para recolha de soro. Todos os soros foram armazenados à temperatura de -20°C até à sua utilização.

2.3 Esfregaços sanguíneos

Utilizando o sangue acondicionado em EDTA, foram realizados os esfregaços sanguíneos. Após secarem ao ar e à temperatura ambiente, durante cerca de uma hora, foram fixados com metanol durante um minuto e de seguida foram corados com corante Giemsa durante 1 a 2 minutos. A remoção do excesso de corante foi feita pela passagem das lâminas em água corrente. Após esta operação as lâminas ficaram a secar à temperatura ambiente. A observação de cada lâmina obedeceu a um conjunto de regras. Primeiro observou-se a lâmina na ampliação de 400x, tendo-se examinado pelo menos 50 campos da lâmina para pesquisa de microfilárias e *Hepatozoon canis*. De seguida, com recurso a óleo de imersão, utilizou-se a ampliação de 1000x e examinaram-se pelo menos 100 campos da lâmina para a pesquisa de inclusões nos leucócitos, eritrócitos e plaquetas, de forma a identificar alguns hemoparasitas que se pudessem encontrar em circulação. A observação da lâmina, em cada uma das ampliações, foi executada com início na periferia do esfregaço, seguindo em “ziguezague” até ao centro do mesmo, onde se encontra uma monocamada de células para uma melhor observação de todos os elementos figurados do sangue.

2.4 Pesquisa de microfilárias pela Técnica de Knott modificada (Bowman, 2003)

Esta técnica permite concentrar e identificar microfilárias em circulação no sangue. Provoca a lise dos eritrócitos e a extensão e conservação das microfilárias, possibilitando desta forma a observação da sua conformação e medição.

Adicionam-se 10 ml de formalina a 2% a 1 ml de sangue em EDTA e homogeniza-se. Segue-se uma centrifugação durante 5 a 8 minutos a 1500 rpm, retira-se o sobrenadante e adiciona-se uma ou duas gotas de azul metileno a 0,1%, ao sedimento. Agitar e colocar algumas gotas da preparação em lâminas, cobrir com lamela e observar ao microscópio ótico na ampliação de 400x.

2.5 Deteção de antígeno solúvel de *D. immitis* por imunocromatografia

O teste rápido utilizado neste estudo é o WITNESS® Dirofilaria do laboratório Zoetis, baseado numa técnica de imunomigração rápida, em que se deteta um antígeno solúvel do ovário de fêmeas adultas de *D. immitis*. A amostra a testar pode ser constituída por sangue total em EDTA ou heparina, soro ou plasma.

Durante a execução do teste existe uma banda de controlo numa das extremidades da membrana do kit que permite assegurar que este foi realizado corretamente. A hemólise das amostras não interfere significativamente com os resultados, segundo as informações fornecidas pelo fabricante. A leitura do resultado é obtida ao fim de dez minutos, sendo possível aferir um resultado positivo antes do tempo se as duas bandas cor de rosa surgirem.

Neste estudo utilizaram-se as amostras de soro e realizaram-se os testes de acordo com as instruções do fabricante.

2.6 Pesquisa de anticorpos por Imunofluorescência Indireta

A técnica de imunofluorescência indireta permite detetar anticorpos específicos produzidos durante infeções por determinados organismos.

Os anticorpos específicos presentes nas amostras de soro em estudo ligam-se aos antígenos específicos presentes nos pocilhos do teste. Após a adição de Ac anti-espécie, neste caso anti-cão, marcados com fluoresceína, estes ligam-se ao complexo antígeno-anticorpo emitindo fluorescência quando observados no microscópio ótico de fluorescência, com um comprimento de onda específico.

Este teste permite avaliar as titulações, em diferentes diluições, de um determinado anticorpo em cada amostra de soro. No início da observação dos resultados da IFI, observam-se primeiro os controlos positivo e negativo no sentido de validar o teste. Os procedimentos para a realização da técnica de IFI para *A. phagocytophilum*, *E. canis*, *L. infantum* e *R. conorii* encontram-se no Anexo I.

Para diminuir a probabilidade de falsos resultados obtidos por IFI, todas as amostras foram observadas pelo mesmo operador devido à subjetividade que a técnica exige, mantendo-se desta forma o mesmo critério definido pelo operador para todas as amostras observadas.

Tabela 1: Testes de IFI utilizados, fabricantes respectivos e limiares de positividade.

Nome do teste	Marca	Limiar de positividade
MegaScreen FLUORICKETTSIA conorii	Megacor®	1:64
MegaScreen FLUOEHRlichia canis	Megacor®	1:40
LEISHMANIA-Spot IF	bioMérieux®	1:80
MegaScreen ANAPLASMA phagocytophilum	Megacor®	1:50

De acordo com a informação fornecida pelo fabricante bioMérieux®, o teste LEISHMANIA-Spot IF utiliza como substrato formas promastigotas obtidas em cultura *in vitro*, inativadas e fixadas em pocilhos numa lâmina. Os soros controlo positivo e negativo para este teste LeishIFI foram provenientes da seroteca do Laboratório de Doenças Parasitárias da FMV-UL. O procedimento deste teste encontra-se no Anexo I. Por facilidade do Laboratório, os soros com resultado positivo na titulação de 1:80 foram submetidos às titulações 1:160 e 1:320.

2.7 Pesquisa de Ac anti- *Babesia* spp. por ELISA

Este teste imunoenzimático permite a deteção e quantificação de anticorpos através de uma reação que promove um resultado colorido do complexo antígeno- anticorpo que após leitura da densidade ótica, a um determinado comprimento de onda (neste caso 450 nm), permite obter a percentagem da densidade ótica de cada amostra e aferir um resultado negativo, duvidoso ou positivo. O nome do teste ELISA utilizado neste estudo é BABESIA-ELISA DOG (Afosa®) cujo procedimento se encontra no Anexo II.

2.8 Análise estatística

O armazenamento dos dados e realização dos gráficos e tabelas foi efetuado com o programa Microsoft® Office Excel 2007. A análise estatística foi realizada através do programa IBM SPSS® Statistics 22. Os testes utilizados para a análise estatística foram o teste do Qui-quadrado e o teste de Fisher. Considerou-se que resultados de $p < 0,05$ determinavam a associação estatística significativa entre diferentes variáveis.

3. RESULTADOS

3.1 Caracterização da amostra

Dos 60 cães de caça estudados no concelho de Loures, 81,7% (49/60) eram fêmeas e 18,3% (11/60) eram machos. As idades dos animais encontravam-se compreendidas entre os 2 e os 14 anos.

Gráfico 2: Caracterização dos cães estudados de acordo com o sexo e a idade (n=60)

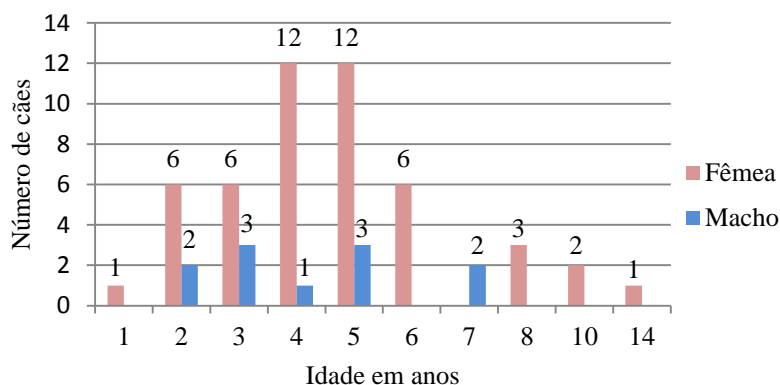
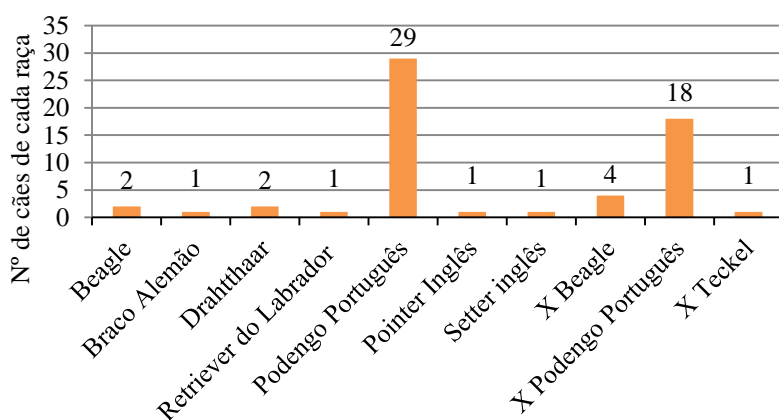


Gráfico 3: Frequência absoluta de cada raça (n=60)

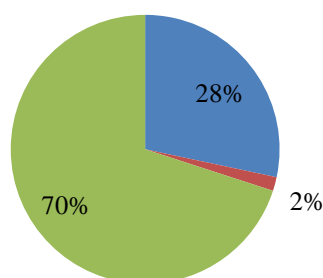


Neste estudo estão representadas 10 raças tradicionalmente utilizadas na caça: Beagle, cruzado de Beagle, Braco Alemão, Deutsch Drahthaar, Pointer Inglês, Retriever do Labrador, Setter Inglês, Podengo Português, cruzado de Podengo Português e cruzado de Teckel. A raça Podengo Português e

os cruzados de Podengo Português predominam, com 48,3% (29/60) e 30% (18/60) dos cães presentes no estudo, respetivamente.

Gráfico 4: Proporção dos tipos de pelagem presentes nos cães em estudo

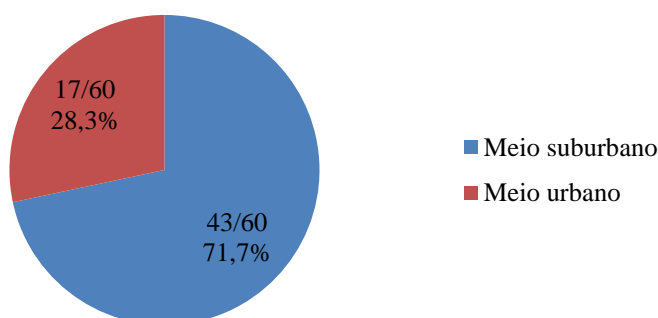
■ Pelagem cerdosa ■ Pelagem comprida ■ Pelagem curta



As pelagens representadas foram três: a curta, presente em 70% (42/60) dos cães, depois a cerdosa em cerca de 28% (17/60) e a comprida, representada por apenas um cão (2%) (n=60).

Todos os cães incluídos neste estudo viviam em canis comuns ou contíguos, construídos em alvenaria e com escoamento das águas de limpeza. O meio envolvente observado em redor dos canis foi classificado como urbano ou suburbano. O ambiente urbano caracterizou-se pela presença de casas de habitação, sem vegetação ou terrenos rurais nas proximidades. O meio suburbano caracterizou-se pela presença de casas de habitação e terrenos rurais (com vegetação abundante) adjacentes.

Gráfico 5: Proporção de cães em meio urbano e suburbano



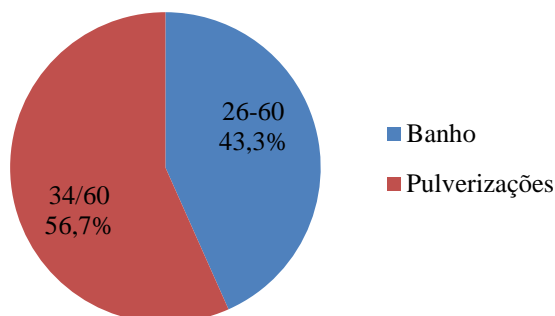
O meio em redor das instalações dos cães era urbano em 28,3% (17/60) dos canis e suburbano em 71,7% (43/60).

3.2 Resultados da informação recolhida juntos dos proprietários

De acordo com a informação disponibilizada pelos donos, a vacinação antirrábica estava atualizada em todos os animais. A desparasitação interna era feita, em média, de seis em seis meses, no entanto

alguns donos referiram que, por lapso, esta era feita apenas na altura em que os cães faziam a revacinação anual da raiva. Já a vacinação polivalente (esgana, parvovirose, hepatite infecciosa canina e leptospirose) era aplicada geralmente nos cachorros, animais esses não incluídos neste estudo.

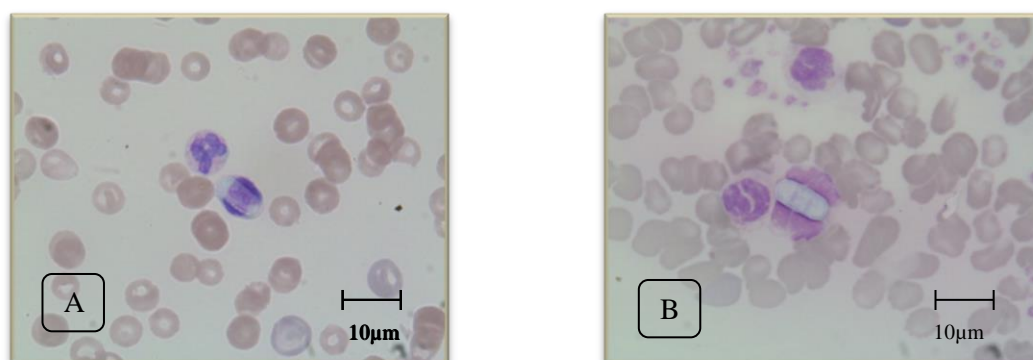
Gráfico 6: Proporção das medidas profiláticas e ectoparasiticidas aplicadas



No que diz respeito às medidas profiláticas e aplicação de ectoparasiticidas, a 43,3% (26/60) dos cães foram aplicadas pulverizações de fipronil e 56,7% (34/60) recebiam banhos acaricidas quando se observavam ectoparasitas. A alimentação de todos os animais incluídos no estudo tinha como base alimento seco (ração), sendo prática comum a complementação esporádica da dieta com frango cozido e massa ou arroz. Todos estes animais apresentavam-se com apetite e atividade física normais.

3.3 Detecção de parasitas em esfregaço sanguíneo

A observação de esfregaços, na ampliação de 400x, permitiu detetar dois animais com formas gamontes de *Hepatozoon canis* em neutrófilos e quatro esfregaços com microfilárias. Na ampliação de 1000x foram detetados dez esfregaços com formas intraeritrocitárias compatíveis com *Mycoplasma haemocanis*.



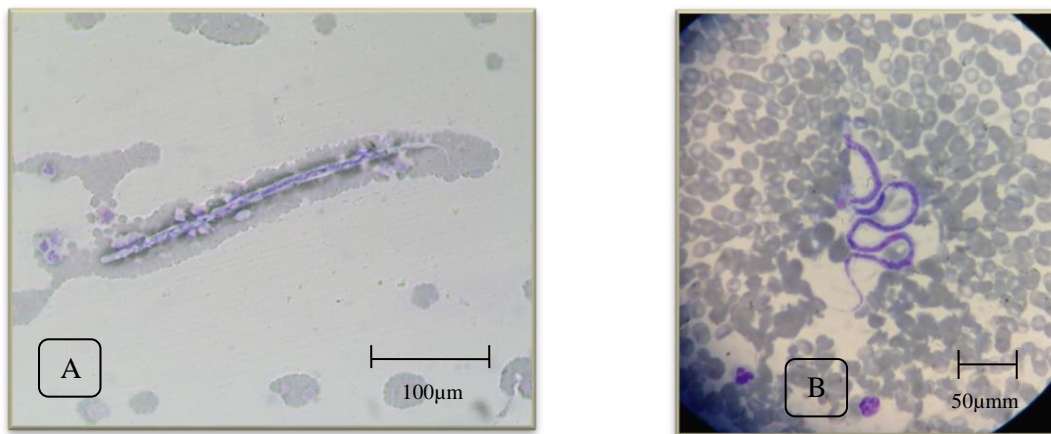


Figura 5: Microfilárias em esfregaço sanguíneo da amostra nº12, com resultado positivo à pesquisa de Ag de *D. immitis* por imunocromatografia. (Originais).

Nos esfregaços de sangue não se observaram formas parasitárias ou inclusões compatíveis com *Anaplasma phagocytophilum*, *A. platys*, *Babesia* spp. ou *Ehrlichia canis* nas células em circulação.

3.4 Detecção de microfilárias pela técnica de Knott modificada

Esta técnica permitiu detetar 12 amostras de sangue com microfilárias. A diferenciação das microfilárias efetuou-se através da análise morfométrica e pesquisa de Ag de *D. immitis*. As medições efetuadas nas microfilárias detetadas permitiram obter um comprimento médio de 210µm, embora numa das amostras o comprimento médio observado das microfilárias foi cerca de 300µm.

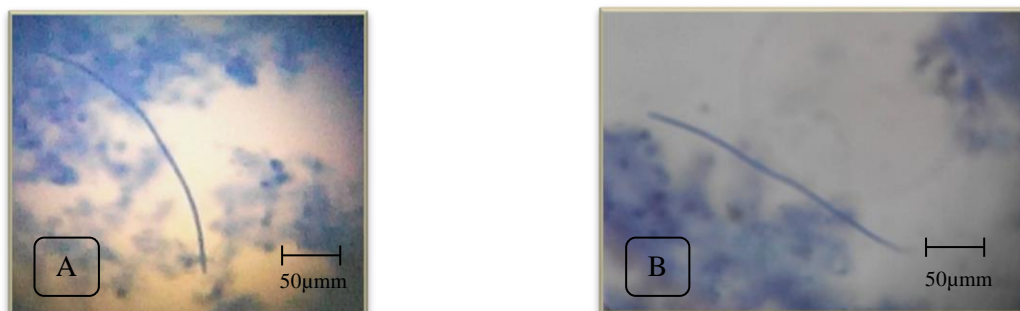


Figura 6: Microfilárias detetadas pela técnica de Knott modificada. A- amostra nº8. B -amostra nº55. (Originais).

3.5 Detecção de antígeno de *Dirofilaria immitis* através de imunocromatografia.

Das 12 amostras de sangue com microfilárias detetadas pela técnica de Knott modificada, apenas um soro teve resultado positivo na deteção de antígeno de *D. immitis*.



Figura 7: A- KIT WITNESS®Dirofilaria. B- Resultado negativo, a cabeça da seta indica ausência de banda no teste. Resultado positivo, a seta inteira indica uma banda cor de rosa, acusando a presença de Ag de *D. immitis* no soro. Ambos os testes apresentam uma banda cor de rosa escura à direita na janela de observação dos resultados, esta representa o controle do teste, validando-o. (Originais).

3.6 Detecção de anticorpos através de IFI

A técnica de IFI foi utilizada para a pesquisa de anticorpos anti-*Anaplasma phagocytophilum*, anti-*Ehrlichia canis*, anti-*Leishmania* spp. e anti-*Rickettsia conorii*.

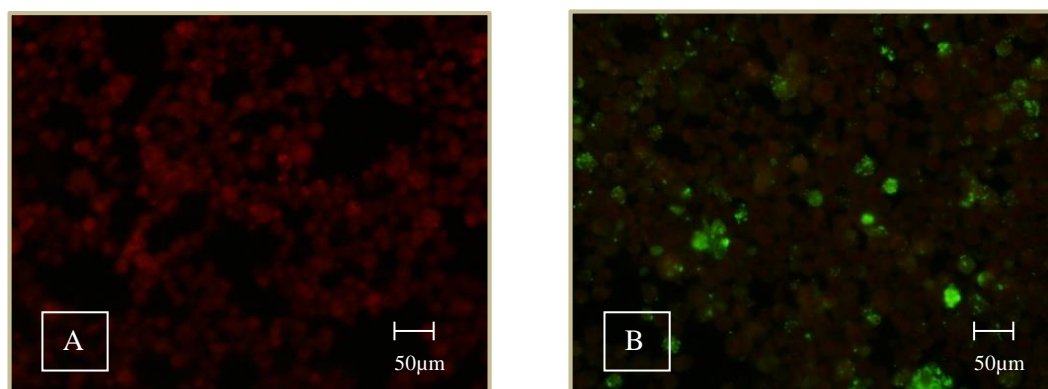


Figura 8: Detecção de anticorpos anti- *Ehrlichia canis* por IFI. A- resultado negativo. B- resultado positivo. (Originais).

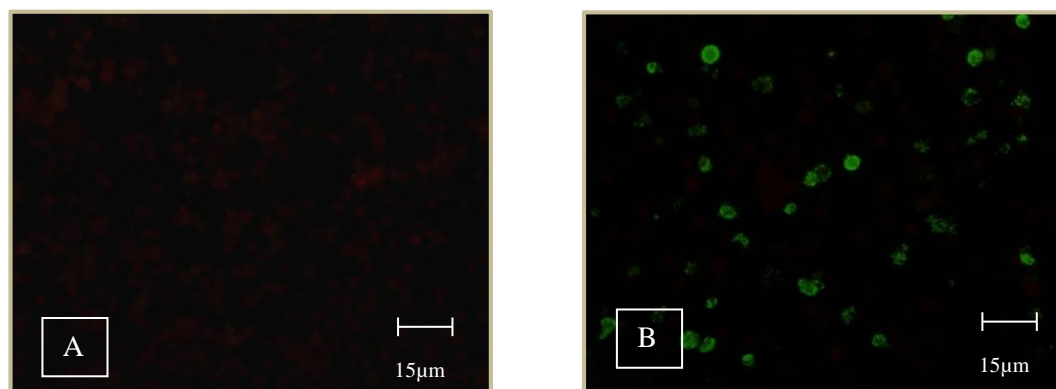


Figura 9: Detecção de anticorpos anti- *Rickettsia conorii* por IFI. A- resultado negativo. B- resultado positivo. (Originais).

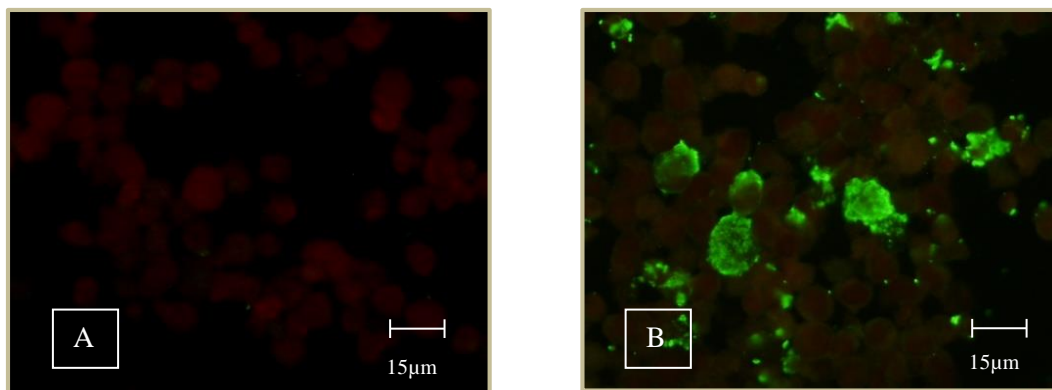


Figura 10: Detecção de anticorpos anti- *Anaplasma phagocytophilum* por IFI. A- resultado negativo. B- resultado positivo. (Originais).

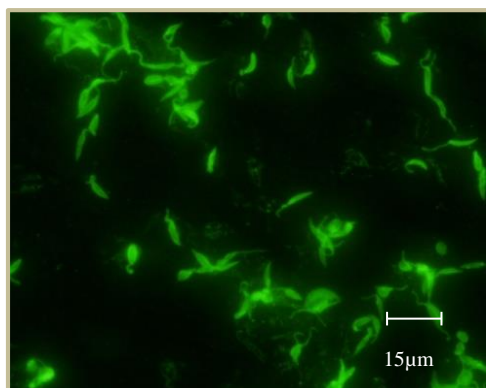


Figura 11: Detecção de anticorpos anti- *Leishmania* spp. por IFI. Resultado positivo. (Original).

3.7 Detecção de anticorpos anti-*Babesia* spp. através de ELISA

Através desta técnica 23,3% (14/60) dos soros obtiveram resultado positivo e 3,3% (2/60) resultado duvidoso.

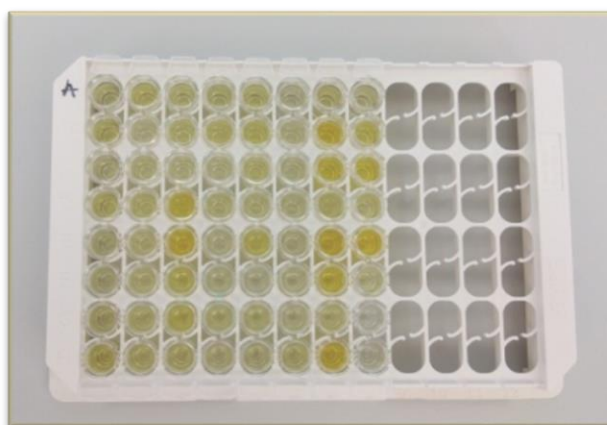
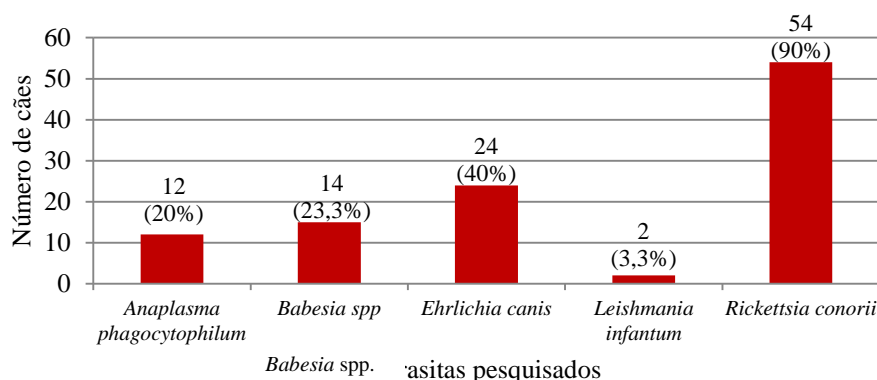


Figura 12: Resultado final da técnica ELISA após adição da solução de paragem. É possível observar os diferentes tons de laranja e amarelo, assim como alguns pocilhos incolores, diferenças que se manifestaram na leitura óptica em espectrofotómetro. (Original).

3.8 Seroprevalências

A detecção de infecção por *A. phagocytophilum*, *E. canis*, *L. infantum* e *R. conorii* foi realizada com recurso à técnica IFI e a detecção de infecção por *Babesia* spp. foi efetuada através da técnica ELISA.

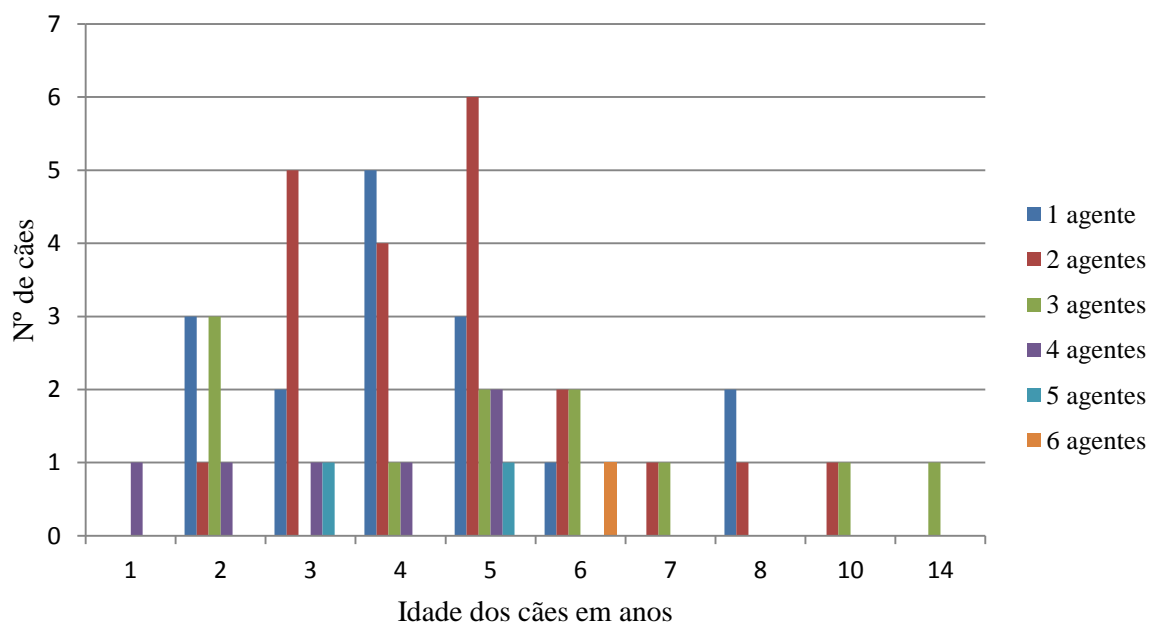
Gráfico 7: Frequência absoluta e relativa das infeções detetadas por técnicas serológicas (n=60)



3.9 Infeções e coinfeções observadas

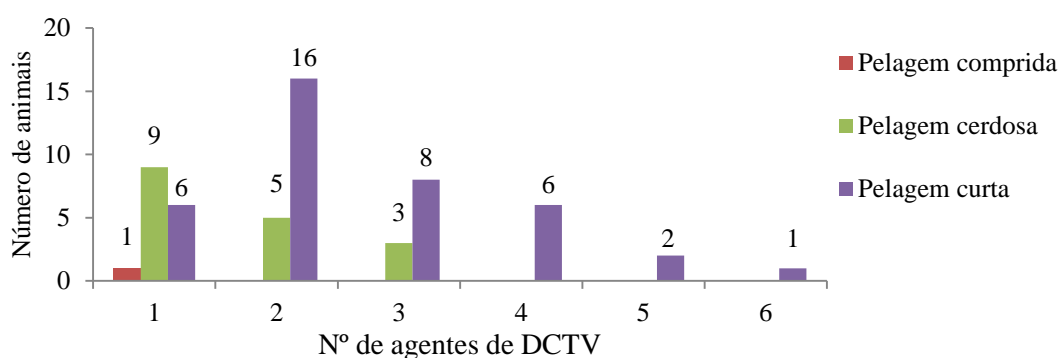
Entre os 60 cães estudados, 95% (57/60) apresentaram evidência de infecção por pelo menos um agente de DCTV. Desses 57 cães, 28,1% (16/57) tinha infecção por apenas um agente; 36,8% (21/57) por dois agentes; 19,3% (11/57) por três agentes; 10,5% (6/57) por quatro agentes; 3,5% (2/57) por cinco agentes e apenas 1,8% (1/57) com infecção por seis agentes.

Gráfico 8: Distribuição das infeções por um ou mais agentes pelas idades dos cães em estudo (n=57)



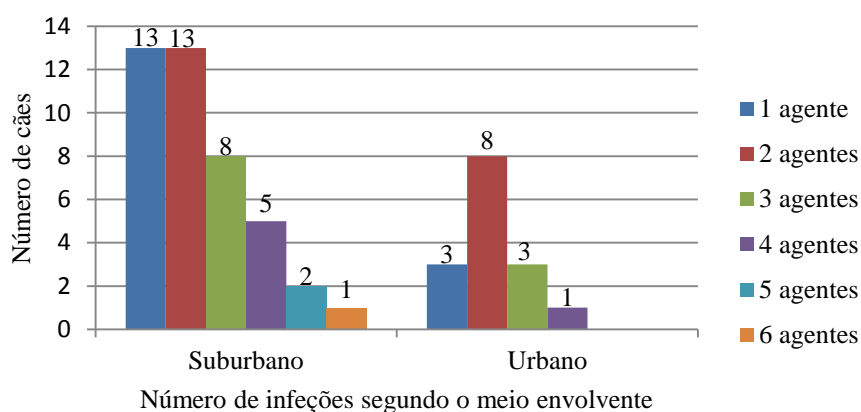
O maior número de coinfeções foi detetado em animais com idade compreendida entre os quatro e os seis anos.

Gráfico 9: Número de agentes de DCTV por tipo de pelagem (n=57)



Foram detetadas infeções em 68,4% (39/57) dos cães com pelagem curta, 21% (12/57) dos cães com pelagem cerdosa e apenas 1,7% (1/57) dos cães com pelagem comprida.

Gráfico 10: Distribuição do número de infeções pelo tipo de meio envolvente (n=57)



Os animais instalados em meio suburbano registaram o maior número de infeções com 73,7% (42/57), incluindo infeções por um, dois, três, quatro, cinco e seis agentes de DCTV. O meio urbano conta com 26,3% (15/57) de animais infetados com infeções por um, dois, três e quatro agentes.



Figura 13: Cadela de caça de raça cruzada de Beagle incluída no presente estudo. (Original).

Está disponível no Anexo IV um quadro geral resumido com informação relativa às informações recolhidas nos dias da colheita e os resultados obtidos através de diferentes técnicas de diagnóstico.

Tabela 2: Prevalência de agentes de DCTV listados por ordem crescente* (n=60)

Nº de agentes	Agentes de DCTV	Frequência Absoluta	Prevalência (%)
1	<i>E. canis</i>	1	1,66
1	<i>R. conorii</i>	13	21,66
1	Microfilárias	2	3,33
2	<i>Babesia</i> spp. + <i>R. conorii</i>	2	3,33
2	<i>E. canis</i> + <i>R. conorii</i>	7	11,66
2	Microfilárias + <i>R. conorii</i>	6	10
2	<i>D. immitis</i> + <i>R. conorii</i>	1	1,66
2	<i>Mycoplasma</i> spp. + <i>R. conorii</i>	4	6,66
2	<i>H. canis</i> + <i>R. conorii</i>	1	1,66
2	<i>A. phagocytophilum</i> + <i>R. conorii</i>	1	1,66
3	<i>Babesia</i> spp.+ <i>E. canis</i> + <i>R. conorii</i>	2	3,33
3	<i>Mycoplasma</i> spp. + <i>E. canis</i> + <i>R. conorii</i>	3	5
3	Microfilária + <i>Babesia</i> spp.+ <i>R. conorii</i>	1	1,66
3	<i>A. phagocytophilum</i> + <i>E. canis</i> + <i>R. conorii</i>	2	3,33
3	<i>Babesia</i> spp. + <i>R. conorii</i> + <i>Leishmania</i> spp.	1	1,66
4	<i>Mycoplasma</i> spp. + <i>A. phagocytophilum</i> + <i>E. canis</i> + <i>R. conorii</i>	1	1,66
4	<i>A. phagocytophilum</i> + <i>Babesia</i> spp. + <i>E. canis</i> + <i>R. conorii</i>	5	8,33
4	Microfilárias + <i>A. phagocytophilum</i> + <i>R. conorii</i> + <i>Babesia</i> spp.	1	1,66
5	<i>Mycoplasma</i> spp. + <i>A. phagocytophilum</i> + <i>Babesia</i> spp.+ <i>E. canis</i> + <i>R. conorii</i>	1	1,66
5	Microfilárias + <i>A. phagocytophilum</i> + <i>Babesia</i> spp.+ <i>E. canis</i> + <i>R. conorii</i>	1	1,66
6	<i>H. canis</i> + <i>Mycoplasma</i> spp. + <i>Babesia</i> spp.+ <i>E. canis</i> + <i>R. conorii</i> + <i>Leishmania</i> spp.	1	1,66

* 3 cães foram negativos para todos os agentes de DCTV avaliados

4. DISCUSSÃO

Os objetivos propostos para esta dissertação sobre o rastreio de agentes de DCTV em 60 cães de caça no concelho de Loures foram alcançados. Detetaram-se alguns parasitas através de esfregaços sanguíneos e verificou-se a exposição de alguns cães a agentes de DCTV através das técnicas serológicas.

O concelho de Loures estima-se endémico para os vetores de DCTV, apresenta um ambiente rico em vegetação para a manutenção de ixodídeos e uma lezíria propícia à manutenção de populações de mosquitos e insetos, aumentando o risco de infeção de animais que circulam na zona e o risco de transmissão de zoonoses.

A caça é uma atividade desportiva que decorre em zonas rurais e durante as horas crepusculares do início do dia até perto da hora de almoço. Assim sendo, os cães de caça são um grupo de risco elevado, devido à exposição prolongada a diversos vetores que transmitem agentes de DCTV, assumindo um importante papel na transmissão de agentes zoonóticos, os quais também representam uma ameaça à saúde dos cães, contribuindo para a diminuição da resposta imunitária, predispondo à infeção por outros agentes (Otranto & Breitschwerdt, 2009).

Das 60 amostras de sangue recolhidas, apenas em 5% (3/60) destas não foram detetadas formas parasitárias ou presença de Ac contra os agentes pesquisados.

Através dos dados recolhidos sobre cada animal foi possível pesquisar a associação entre as características dos animais, o alojamento, o meio envolvente, as medidas profiláticas aplicadas e as infeções detetadas pelas diferentes técnicas.

Neste estudo não foi possível realizar análises clínicas por motivos logísticos e económicos.

4.1 Caracterização da amostra

Dos 60 cães de caça presentes neste estudo 81,7% (49/60) eram do sexo feminino e 18,3% (11/60) do sexo masculino. O predomínio do sexo feminino está relacionado com a preferência dos caçadores em utilizar cadelas. Além de produzirem ninhadas e representarem uma fonte de rendimento, demonstram maior capacidade de concentração do que os machos.

No que concerne à idade 61,6% dos animais tinham idade compreendida entre os 3 e os 5 anos, sendo esta a fase da vida de maior atividade destes cães antes da sua retirada para reprodução ou reforma, devido à diminuição do seu rendimento durante a caça.

A raça mais representada foi o Podengo Português com 48,3 % (29/60), seguida do cruzado de Podengo Português com 30% (18/60). Esta é uma raça autóctone com grande aptidão para a caça ao coelho bravo e tem-se mantido bastante popular entre os caçadores devido à sua rusticidade (Clube do Podengo Portugês, 2015). O cruzado de Beagle foi a terceira raça mais representada com 6,6% (4/60), seguida do Beagle, Deutsch Drahthaar, Retriever do Labrador, Setter Inglês, Pointer, Cruzado de Teckel e por último o Braco Alemão.

Visto tratar-se de cães de caça a vacina antirrábica foi a maior preocupação dos proprietários devido ao licenciamento dos animais para a época da caça e para o seu transporte. Neste estudo nenhum dos cães tinha sido revacinado no ano anterior com vacinas polivalentes.

Observou-se um maior número de infecções por agentes de DCTV nos cães instalados em meio suburbano do que nos cães em meio urbano, no entanto não se verificou uma associação estatisticamente significativa.

Os banhos com produtos acaricidas (amitraz) e as pulverizações com acaricidas (fipronil) foram as únicas medidas profiláticas verificadas neste estudo. Segundo a opinião de alguns proprietários, entre animais que caçavam na mesma zona e aos quais foram aplicadas pulverizações com o composto fipronil, a eficácia pareceu variar entre animais, havendo relatos da presença de ixodídeos mesmo após a aplicação do composto.

A aparente diminuição da eficácia das pulverizações de fipronil poderá estar relacionada com a forma como estas são aplicadas. A aplicação das pulverizações deve ser efetuada de acordo com as instruções do fabricante (Merial, 2013), condição essencial para a máxima eficácia na utilização destes compostos (Dantas-Torres, 2008). Outra questão a ter em consideração é o fato da ação dos compostos disponíveis para pulverização ser imediata, no entanto a sua atividade residual é curta (Otranto Dantas-Torres, 2013).

Na opinião dos proprietários de cães de caça, os banhos acaricidas com amitraz são eficientes na remoção dos parasitas externos, sendo a maior desvantagem a sua aplicação quando a temperatura ambiente é baixa. A sub-dosagem dos produtos a diluir na água do banho também pode ter contribuído para uma menor eficácia destas medidas acaricidas pois constatou-se que as diluições eram realizadas de forma empírica sem se recorrer à medição exata da quantidade de concentrado utilizado. A aplicação dos banhos não foi constante nos cães de caça estudados, esta era realizada após a deteção da presença de ixodídeos adultos, de acordo com as práticas descritas pelos caçadores. As carraças popularmente designadas “chumbinho” são formas juvenis (ninfas) que muitas vezes passam despercebidas na inspeção visual dos cães (ESCCAP, 2015), não sendo aplicadas quaisquer medidas ectoparasiticidas no momento. Ocorre assim a disseminação de ixodídeos entre animais do mesmo canil, onde a densidade populacional promove a manutenção dos vetores ixodídeos com consequente aumento do risco de transmissão de agentes de DCTV (Dantas-Torres, 2010; Gray *et al.*, 2013).

No que diz respeito à aplicação de unções punctiformes, unções contínuas, coleiras impregnadas e pó, estas apresentações não foram utilizadas pelos proprietários dos cães de caça do presente estudo. As razões apontadas foram o custo elevado dos produtos para um grande número animais; a possível diminuição da eficácia dos produtos após exposição dos cães aos vários tipos de terreno em que decorria a caça (terra, areia, água) e a facilidade com que as coleiras impregnadas podem ser arrancadas pela vegetação ou por outros cães, desmotivando os proprietários a aplicar este tipo de apresentação nos cães de caça. De fato, Beugnet (2013) afirma que a proteção conferida pelos

repelentes e ectoparasitidas, em condições naturais (exterior, chuva, vento, pó, etc.) é eficaz mas não atinge os 100%.

Na prevenção de infecção por agentes de DCTV em cães de caça, foi possível identificar alguma irregularidade na aplicação de medidas contra ectoparasitas nos animais onde esta profilaxia foi efetuada. Rodrigues (2014) também observou que a profilaxia praticada pelos caçadores era, por norma, insuficiente.

4.2 Detecção de hemoparasitas em esfregaços sanguíneos

Embora os esfregaços sanguíneos sejam pouco sensíveis na deteção de infecção crónica por DCTV, a sua observação durante a fase aguda da doença poderá, em alguns casos, permitir a confirmação de infecção por algumas DCTV com um custo reduzido, especialmente nas infeções por *Anaplasma* spp. (Kohn *et al.*, 2008), *Babesia* spp. (Farkas, 2013), *Ehrlichia canis* (Mylonakis *et al.*, 2003; Sainz *et al.*, 2015), *Hepatozoon canis* (Otranto *et al.*, 2011), *Mycoplasma* spp. (Compton *et al.*, 2012) e por microfilárias (AHS, 2014; Magnis *et al.*, 2013; Roberts & Janovy, 2009).

A observação dos esfregaços resultou na deteção de formas parasitárias em 26,6% (16/60) das amostras. Observaram-se 16,6% (10/60) de amostras com formas compatíveis com *Mycoplasma* spp. em eritrócitos, 3,3% (2/60) de amostras com formas gamontes de *Hepatozoon canis* em neutrófilos e 6,6% (4/60) de amostras com microfilárias. A realização de esfregaços com sangue capilar teria aumentado a sensibilidade desta técnica, no entanto, devido a dificuldades logísticas nos locais de recolha não foi possível realizar este tipo de esfregaços.

Tendo em conta que os animais se apresentavam sem alterações do estado geral dignas de registo, sendo considerados assintomáticos, era expectável a baixa prevalência de formas parasitárias nos esfregaços sanguíneos. Esta situação relaciona-se com a sua presença maioritariamente durante a fase aguda da doença, caracterizada pela multiplicação e disseminação nas células sanguíneas em circulação, com manifestação clínica da doença. Contudo a parasitémia é baixa e intermitente nos animais assintomáticos ou com doença crónica (Nicholson *et al.*, 2010; Kohn *et al.*, 2008; Carrade *et al.*, 2009).

4.2.1 Detecção de *Hepatozoon canis*

Foram detetados dois esfregaços com inclusões morfolologicamente compatíveis com *Hepatozoon canis* em vários neutrófilos, representando 3,3% (2/60) do total de amostras de sangue observadas.

Embora alguns autores não tenham detetado este hemoparasita através de esfregaços em estudos recentes (Santos, 2014; Vidal, 2013), outros reportaram prevalências semelhantes às deste estudo. Figueiredo (2008) detetou 2,1% (19/473) na observação de esfregaços e Caeiros (2012) detetou 2,5% (2/80) através de esfregaços e 8% (7/80) por PCR. A baixa sensibilidade da observação citológica de sangue na pesquisa de infecção por *H. canis* contribui para a subestimada prevalência deste parasita, no entanto é o método de diagnóstico mais acessível e utilizado (Otranto *et al.*, 2011). Em infeções

crônicas por este agente, o nível de parasitemia é baixo e intermitente, podendo existir apenas 1 a 5% de neutrófilos infetados (Baneth *et al.*, 2003). Estando o hospedeiro canino bem adaptado a este parasita, a infecção é geralmente assintomática e a sua importância epidemiológica tem sido negligenciada, havendo poucos estudos sobre a incidência desta infecção em zonas endêmicas (Otranto *et al.*, 2011). É importante referir que este agente pode contribuir para o agravamento do estado clínico em coinfeções com outros hemoparasitas (Baneth *et al.*, 2003; Baneth, 2012). Em zonas endêmicas, a prevalência ronda entre 1% e 39% quando detetada através de esfregaços de sangue e até 63,2% através de PCR (Otranto *et al.*, 2011). As técnicas moleculares permitem uma elevada sensibilidade na deteção e identificação das espécies envolvidas (Baneth, 2012; Caeiros, 2012; Cardoso *et al.*, 2010); Karagenc *et al.*, 2006; Criado-Fornelio *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008). Embora as técnicas serológicas detetem anticorpos que indicam exposição ao agente e não a presença de infecção ativa no momento da pesquisa, estas obtiveram bons resultados em estudos epidemiológicos (Karagenc *et al.*, 2006). Na ausência destas técnicas, a citologia da camada flogística é preferível à de sangue total (Otranto *et al.*, 2011).

Além da ingestão do ixodídeo infetado, o comportamento de predação de pequenos mamíferos é uma das vias possíveis de transmissão de *Hepatozoon canis* ao cão doméstico (Baneth, 2012). As raposas podem participar neste ciclo de transmissão. Em Portugal, um estudo realizado com recurso a PCR, de Norte a Sul do país, detetou a elevada prevalência de 75,6% (68/90) de raposas infetadas (Cardoso *et al.*, 2014).

Os resultados obtidos na deteção de *H. canis* neste estudo alertam para a necessidade da realização de mais estudos para a deteção e mapeamento da distribuição deste protozoário a nível nacional. Considera-se importante uma abordagem mais completa nos métodos utilizados na deteção desta infecção, nomeadamente a complementação com técnicas moleculares.

Visto que os cães de caça são expostos regularmente a zonas rurais, o contato destes com o vetor *R. sanguineus* infetado com *H. canis* é muito provável de ocorrer.

4.2.2 Deteção de *Mycoplasma spp.*

Atualmente estão identificados dois hemoplasmas caninos: o *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* e o *Mycoplasma haemocanis* (Sykes *et al.*, 2004; Sykes, Ball, Bailiff & Fry, 2005). A identificação destes hemoplasmas era somente feita pela observação de esfregaços de sangue até ao aparecimento da técnica de PCR (Compton *et al.*, 2012; Pitorri *et al.*, 2012). A confirmação de infecção por estes agentes através de PCR é um método bastante mais sensível do que a deteção em esfregaços sanguíneos, visto que pontuações basofílicas podem ser confundidas com *Mycoplasma spp.* (Hulme-Moir, Barker, Stonelake, Helps & Tasker, 2010; Kemming *et al.*, 2004; Kenny *et al.*, 2004; Messick & Harvey, 2012) e o armazenamento prolongado do sangue em tubo com EDTA pode promover a libertação dos organismos da periferia dos eritrócitos, por essa razão os esfregaços devem ser realizados o mais rápido possível e, de preferência, com uma gota fresca de sangue logo após a recolha

(Kraje, 2001). Os eritrócitos parasitados têm tendência a ficar encurralados em capilares sanguíneos na zona do pavilhão auricular, razão pela qual a observação de esfregaços de sangue capilar aumenta a sensibilidade na deteção destes parasitas (Kraje, 2001).

O insucesso da cultura *in vitro* destes organismos não permitiu até hoje a realização de substratos para testes serológicos específicos para este parasita ou o isolamento do mesmo (Compton *et al.*, 2012).

Neste estudo foram observadas formas compatíveis com *Mycoplasma* spp. em 16,6% (10/60) dos esfregaços. Não foi possível proceder à deteção e identificação de *M. haemocanis* e *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* por técnicas moleculares nem obter amostras de sangue capilar ou gota fresca, portanto a confirmação de infeção por hemoplasmas ficou apenas descrita pela observação de esfregaços feitos a partir de sangue em EDTA, técnica com baixa sensibilidade segundo as razões já mencionadas.

Existem poucos dados epidemiológicos sobre *Mycoplasma* spp. em Portugal. Vidal (2013) observou 2,3% (3/129) em esfregaços de cães com funções militares e policiais, um resultado bastante inferior ao do presente estudo. A menor prevalência observada por Vidal deve-se ao esquema profilático instituído pela GNR, reflectindo-se numa menor exposição ao presumível vetor de *Mycoplasma* spp., o ixodídeo *R. sanguineus* (Novacco *et al.*, 2010; Wengi *et al.*, 2008).

Em 2010, Novacco *et al.* realizaram um rastreio através de técnicas moleculares em Portugal e detetaram 40% (20/50) de infeção por *M. haemocanis*, embora não tenham identificado *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* em nenhuma das amostras. Assim se confirma uma elevada prevalência de infeção *M. haemocanis* em animais que permanecem sem sinais clínicos, designadamente anemia, constituindo um reservatório.

Em termos de saúde pública, a deteção deste parasita não é relevante, sendo mais importante no diagnóstico de quadros clínicos relacionados com anemia hemolítica em cães esplenectomizados (Beaufils, 2012; Chalker, 2005; Pitorri *et al.*, 2012), imunossuprimidos ou com doenças concomitantes (Hulme-Moir *et al.*, 2010; Kemming *et al.*, 2004; Kraje, 2001), e em animais dadores de sangue (Compton *et al.*, 2012; Sykes *et al.*, 2004).

A probabilidade de detetar este parasita é maior em cães de canil, situação que se verifica no grupo de cães estudados (Hulme-Moir *et al.*, 2010; Kemming *et al.*, 2004; Novacco *et al.*, 2010).

4.3 Deteção de anticorpos pela técnica de IFI

A taxa de infeção numa população de cães expostos a DCTV varia substancialmente de acordo com as técnicas usadas na deteção de infeção provocada pelos diferentes agentes. A utilização exclusiva de métodos serológicos leva a uma taxa subestimada da verdadeira prevalência das infeções (Dantas-Torres *et al.*, 2012b). Por esta razão, os métodos moleculares são um importante complemento na deteção e identificação de agentes de DCTV (Ebani *et al.*, 2015; Michelet *et al.*, 2014). Devido a motivos logísticos não foi possível incluir técnicas moleculares neste estudo.

As prevalências obtidas através das técnicas serológicas realizadas comprovam uma resposta humoral, no entanto não permitem distinguir infecção ativa de exposição anterior ao agente. Consequentemente, em zonas endêmicas para determinadas DCTV, é aconselhável interpretar com prudência estes resultados especialmente quando os animais se apresentam assintomáticos.

4.3.1 *Anaplasma phagocytophilum*

A IFI é adequada para pesquisa de exposição a este agente pois os Ac podem permanecer em circulação até 12 meses após a infecção (Poitout, Shinozaki, Stockwell, Holland & Shukla, 2005). Uma das limitações desta técnica são as reações cruzadas com *A. platys* e *Ehrlichia* spp. (Carrade *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2009). A complementação com técnicas moleculares seria essencial para identificar corretamente o agente etiológico presente (Santos *et al.*, 2009).

Neste estudo todos os resultados positivos na IFI foram considerados como infecções por *A. phagocytophilum*. A seropositividade a este agente foi detetada em 20% (12/60) das amostras. Dos 12 soros positivos, 8 soros pertenciam a cães que eram pulverizados com o composto fipronil e 4 soros pertenciam a cães que tinham sido alvo de banho acaricida com o composto amitraz. Estes resultados sugerem que a aplicação das pulverizações poderá ter sido irregular ou incorreta, comprometendo a sua máxima eficácia (Dantas-Torres, 2008; Merial, 2013), contudo a curta atividade residual das pulverizações (Otranto Dantas-Torres, 2013) também pode estar implicada. Os banhos eram realizados após a deteção dos ixodídeos, permitindo a fixação destes e a infecção dos cães.

Um valor semelhante foi obtido por Silva (2011) com 12,5% (10/80) na zona de Setúbal, Figueiredo (2008) com 17,6% (83/473) em Bragança e Caeiros (2012), em Lisboa, com 18,7% (17/80). Sainz *et al.* (2015) em Espanha detetaram prevalências mais baixas, entre os 3 e 15%. Já Santos (2014) obteve uma elevada prevalência na zona de Vila Franca de Xira com 34% (28/80), condição explicada pelo grupo em estudo, isto é, animais errantes com provável ausência de medidas profiláticas, muitos deles demonstrando ectoparasitas. Na deteção de *Anaplasma* spp., Cardoso *et al.* (2012) detetaram 2,9% (16/557) e 3,2% (20/628) de infecção por *Anaplasma* spp. em cães sãos e suspeitos de DCTV respetivamente, uma prevalência abaixo das anteriores. Na Europa a seroprevalência deste agente pode chegar aos 57%, em alguns países, de acordo com estudos efetuados por diferentes métodos serológicos em diversos grupos de cães sintomáticos e assintomáticos (Sainz *et al.*, 2015). A deteção de *A. platys* em Portugal segundo vários autores (Cardoso *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2009), a evidência da sua existência em ixodídeos (Maia *et al.*, 2014), a ampla distribuição e a elevada prevalência do seu vetor (a carraça *R. sanguineus*) sugerem que as infecções detetadas por IFI de Ac anti-*A. phagocytophilum*, também podem ser por *A. platys*. Esta consideração sustenta a hipótese de que existe uma prevalência sobrestimada de *A. phagocytophilum* em estudos epidemiológicos que utilizem apenas IFI, tendo em conta as reações cruzadas que correm dentro do género *Anaplasma* spp. (Miró *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2009). No sentido de caracterizar e mapear as infecções por *Anaplasma* spp.

corretamente, é fundamental associar técnicas moleculares tanto no diagnóstico como em estudos epidemiológicos (Miró *et al.*, 2013; Maggi *et al.*, 2014).

No que se refere a nível de saúde pública a autora considera importante referir que os vetores *R. sanguineus* e *I. ricinus* são das espécies de carrças mais comumente retiradas de humanos em Portugal (Santos-Silva *et al.*, 2011). A Anaplasmoose Granulocítica Humana, provocada por *A. phagocytophilum*, transmitida por *I. ricinus*, apesar de ser caracterizada por um quadro clínico febril e poder ser autolimitante, é potencialmente fatal para pessoas com infeções oportunistas concomitantes (Nicholson *et al.*, 2010; Sainz *et al.*, 2015). A transmissão de AGH ocorre entre humanos através de transfusão sanguínea (Annen, Friedman, Eshoa, Horowitz, Gottschall & Straus, 2012; Kemperman, Neitzel, Jensen *et al.* 2008) e infeção perinatal durante a gestação (Dhand, Nadelman, Agüero-Rosenfeld, Haddad, Stokes & Horowitz, 2007). A importância de vigiar esta doença realça o risco da transposição da barreira interespecie ao permitir a transmissão vertical no Homem. O cão doméstico tem um papel importante como espécie sentinela na exposição do Homem a carrças infetadas por *Anaplasma phagocytophilum* (Carrade *et al.*, 2009; Sainz *et al.*, 2015).

4.3.2 *Ehrlichia canis*

No caso da infeção por *E. canis*, a visualização de mórulas em esfregaços é rara e ocorre em cerca de 4% a 6% dos casos, incluindo infeções agudas. Mesmo quando realizada por pessoal experiente, a observação de esfregaços pode resultar em falsos positivos dada a semelhança com as mórulas de *A. phagocytophilum*. Por esta razão a identificação por PCR da espécie é imprescindível para a diferenciação das mórulas de *E. canis* das mórulas de *A. phagocytophilum*. A probabilidade de visualizar as mórulas aumenta em esfregaços da camada flogística ou de sangue capilar, assim como a observação de citologias de aspirados de linfonodos, medula óssea e baço (Faria *et al.*, 2010; Mylonakis *et al.*, 2003; Sainz *et al.*, 2015).

Em 2009, Alexandre *et al.* identificaram a espécie *E. canis*, com recurso a PCR, como o agente da Erliquiose Canina em Portugal. Em 2015, Sainz *et al.* afirmaram ser esta a única espécie do género *Ehrlichia* isolada na Europa.

Os países da bacia do Mediterrâneo e do sul da Europa são endémicos para *E. canis* e a distribuição deste agente acompanha a distribuição do vetor *R. sanguineus*. Visto que este agente não sofre transmissão vertical, a presença de animais infetados é imprescindível para a manutenção da infeção numa população de cães (Trapp *et al.*, 2006).

Vários focos endémicos foram localizados em Itália, Espanha e Portugal (René-Martellet *et al.*, 2015), alertando para a necessidade de identificar e vigiar estes países com o intuito de instituir medidas que visem diminuir a incidência nestes países.

No presente estudo optou-se pela pesquisa de infeção por *E. canis* através de esfregaços e técnicas serológicas. Na observação dos esfregaços não foram detetadas mórulas, no entanto obtiveram-se resultados positivos para Ac anti- *E. canis* em 40% (24/60) das amostras, uma prevalência alta e

próxima da obtida por Santos (2014) em Vila Franca de Xira, com 34% (29/80), sendo bastante elevada quando comparada com a obtida por Caeiros (2012) em Lisboa, com 4,8% (8/80) e a de Silva (2011) em Setúbal, com 16,25% (13/80) e a de Figueiredo (2008) em Bragança, com 14,8% (70/473). A bactéria *E. canis* já foi detetada em raposas de Norte a Sul do país por Cardoso *et al.* (2015), ou seja, encontra-se disseminada no ciclo silvestre em Portugal. O contato dos cães de caça com vetores infetados que se encontrem em zonas silvestres propicia a transmissão deste agente para o ciclo doméstico, não representando um risco zoonótico (Harrus *et al.*, 2012; Nicholson *et al.*, 2010) mas sim um risco para a saúde dos animais.

Dos 24 soros positivos, 15 pertenciam a cães aos quais eram aplicadas pulverizações de fipronil e aos restantes 9 eram aplicados banhos acaricidas quando eram detetados ectoparasitas. Nesta infeção em particular observou-se maior número de infeções nos cães com medidas profiláticas. Este acontecimento pode estar relacionado com a incorreta aplicação do produto que compromete a sua máxima eficácia (Dantas-Torres, 2008; Merial, 2013) e com a curta atividade residual das pulverizações (Otranto Dantas-Torres, 2013).

4.3.3 *Leishmania infantum*

A LCan é uma doença sistémica com potencial zoonótico e com grande impacto na clínica de pequenos animais por toda a Europa e é fundamental incluir a sua pesquisa em estudos epidemiológicos que contemplem doenças transmitidas por vetores. De acordo com informações fornecidas pelo Observatório Nacional das Leishmanioses, a LCan em Portugal Continental apresenta-se endémica em várias zonas como a região de Trás-os-Montes e Alto-Douro, a sub-região da Cova da Beira, o concelho da Lousã, a região de Lisboa, Setúbal e Algarve. Também se estima endémica em algumas áreas do Alentejo, assim como no concelho de Évora e em algumas zonas do Ribatejo.

Atualmente a LCan tem vindo a surgir em áreas previamente não afetadas (Oliveira *et al.*, 2010) seguindo a tendência da disseminação da infeção para o norte da Europa (Solano-Gallego *et al.*, 2011). De acordo com os últimos dados da Organização Mundial da Saúde, não foram reportados casos de Leishmaniose Humana referentes ao nosso país em 2011 e 2012 tendo sido reportados entre 2005 e 2010, 88 casos. No entanto o INSA (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge) entre 2011 e 2013 recebeu 65 requisições para o diagnóstico laboratorial de *Leishmania*, tendo sido detetados nove casos positivos, três crianças e seis adultos. Em cinco dos adultos, residentes no distrito de Setúbal, foi detetada a coinfeção por leishmaniose e VIH. Das três crianças, duas pertenciam também ao distrito de Setúbal, sendo a outra residente no distrito de Vila Real (Núncio & Alves, 2014).

Segundo Pennisi (2015) o cão doméstico é tradicionalmente considerado o principal reservatório, devido à elevada prevalência de infeção detetada em zonas endémicas para *Leishmania infantum*, sendo fundamental a deteção, tratamento e vigilância de animais infetados. A importância da pesquisa de infeção por *L. infantum* em cães que circulem em zonas silvestres, como é o caso dos cães de caça, prende-se com a necessidade de identificar elos de ligação entre as várias populações de risco na

transmissão e manutenção de *L. infantum* no ciclo doméstico e peri doméstico, como roedores e lagomorfos (Díaz-Sáez *et al.*, 2014; Helhazar *et al.*, 2013; Molina *et al.*, 2012; Pennisi, 2015). Igualmente importante é o reconhecimento da população de felídeos domésticos e errantes como reservatórios competentes na manutenção da infecção (Garrido, 2012; Gomes, 2015; Gramiccia, 2011; Maia *et al.*, 2010; Maia *et al.*, 2014; Pennisi, 2015).

Segundo a OIE (2008) e o Grupo LeishVet (Solano-Gallego *et al.*, 2011), os métodos serológicos de referência para o diagnóstico da LCan e LVH são a IFI e ELISA. Estas técnicas são bastantes sensíveis em animais sintomáticos (Miró *et al.*, 2008) devido à exagerada resposta imunitária humoral (não protetora) que acompanha a doença (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008; Noli & Saridomichelakis, 2014).

No que concerne à IFI, Mettler *et al.* (2005) concluíram que esta técnica é bastante específica (cerca de 100%) e sensível no diagnóstico de animais sintomáticos (90%), contrastando com a baixa sensibilidade (29,4%) observada na detecção de infecção em animais assintomáticos devido ao baixo título de anticorpos. No mesmo sentido, Miró *et al.* (2008) e Sousa *et al.* (2011) reportaram maior prevalência de seropositividade em cães sintomáticos em relação aos assintomáticos.

A seroconversão pode ocorrer entre 1 a 22 meses (Oliva *et al.*, 2006), em média cinco meses segundo Paltrinieri *et al.* (2010), pelo que a detecção de Ac durante esse período de tempo é imprevisível, logo os testes serológicos não são a técnica *gold standard* na detecção de infecção em animais assintomáticos (Otranto & Dantas-Torres, 2013). No entanto o seu custo acessível e fácil execução, torna a IFI num dos métodos de diagnóstico mais utilizados em estudos epidemiológicos na Europa (Bourdeau *et al.*, 2014) com as condicionantes inerentes (Otranto & Dantas-Torres, 2013). É importante definir o limiar de positividade para as titulações da imunofluorescência. Este valor oscila entre laboratórios e pode variar de 1:40 a 1:320 (Gramiccia, 2011). Na presente dissertação o limiar de positividade considerado foi 1:80. Dos 60 soros testados, apenas 3,3% (2/60) dos soros tiveram resultado positivo na execução da titulação de 1:80, 1:160 e 1:320.

O teste Leishmania-SpotIF do fabricante bioMérieux®, utilizado neste estudo, apresenta como antígeno formas promastigotas completas em vez de antígenos recombinantes. Apesar de bastante específico e sensível na detecção de infecção por *L. infantum*, este tipo de Ag parece diminuir a sensibilidade na detecção de cães infectados assintomáticos (Baneth & Solano-Gallego, 2012; Miró *et al.*, 2008).

A reação cruzada pode ocorrer em animais infetados com *Trypanosoma* spp., nomeadamente com *T. cruzi* (doença de Chagas) pelo que se aconselha precaução na interpretação dos resultados em zonas endémicas para ambos os protozoários, devendo o clínico ter em conta os sinais clínicos e os resultados de outros testes. A infecção por *T. cruzi* é observada frequentemente nas zonas centro e sul do Continente Americano e em algumas zonas no sul dos EUA (Baneth, 2008; Baneth & Solano-Gallego, 2012; Paltrinieri *et al.*, 2010; Snowden & Kjos, 2012), sendo a reação cruzada pouco provável de ocorrer nos testes serológicos efetuados na Europa.

A reação cruzada entre *Leishmania* spp., o género *Babesia* e a espécie *Ehrlichia canis*, durante a realização da IFI não se observou em trabalhos realizados por Oliveira, Furuta, Carvalho & Machado, (2008) e Llera, García, Reinoso & González (2002). No entanto, outros autores detetaram reação cruzada no decorrer do diagnóstico serológico da LCan, na presença de infeções concomitantes por *Ehrlichia* spp. e *Babesia canis* (Gomes & Cordeiro, 2004) citado por Oliveira *et al.*, (2008).

No presente estudo, realizado em cães assintomáticos e na ausência de análises hematológicas e bioquímicas para confirmar ou descartar a presença de infeção por *Leishmania* ou outros agentes que possam fazer reação cruzada, os resultados obtidos pela IFI para *Leishmania infantum* foram considerados como isentos de reação cruzada com qualquer outro agente parasitário.

Em zonas endémicas, os animais infetados por *L. infantum* podem desenvolver, resistir ou debelar a doença intermitentemente, sem manifestação de sinais clínicos, ou seja, a infeção não implica desenvolvimento da LCan (Baneth & Arouch, 2008). De acordo com a resposta imunitária e a história clínica de cada cão, a interpretação dos resultados das técnicas serológicas poderá ser a seguinte:

A seropositividade ou um nível baixo de Ac pode indicar exposição ao parasita sem manifestação da doença (Baneth *et al.*, 2008); infeção inicial ou persistente que poderá evoluir para doença caso se observe um aumento progressivo da concentração de Ac (Oliva *et al.*, 2006) ou Ac persistentes após tratamento, mesmo após a resolução dos sinais clínicos (Baneth & Arouch, 2008).

Na presença de uma titulação positiva baixa o mais indicado é repetir a pesquisa de Ac após 30 dias para determinar se era apenas um título residual ou uma infeção ativa em progresso (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). Níveis altos de Ac estão associados a elevada carga parasitária com consequente manifestação da LCan ou início da resposta imunitária que irá progredir e resultar em doença (Baneth & Solano-Gallego, 2012; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008; Reis *et al.*, 2006; Oliva *et al.*, 2006; Solano-Gallego *et al.*, 2011). Salienta-se a presença, por vezes, de anticorpos vacinais (VIRBAC, 2012) sendo este um obstáculo no diagnóstico serológico tanto em animais cuja história clínica não seja conhecida ou em animais vacinados com manifestações de doença (Otranto & Dantas-Torres, 2013; Pennisi, 2015). No mercado português está disponível um teste rápido que faz a distinção dos Ac vacinais induzidos pela vacina CaniLeish®, detetando apenas os Ac produzidos no decorrer de infeção natural por *Leishmania* (Virbac, 2012).

Um resultado negativo pode indicar verdadeira ausência de infeção (Ferreira *et al.*, 2007), uma concentração insuficiente de Ac, isto é, um cão infetado pode ser seronegativo (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008), ou a técnica utilizada e/ou o limiar de positividade não serem os mais adequados (Gramiccia, 2011).

Em caso de suspeita de infeção num cão seronegativo, é recomendado vigiar estes animais com uma nova titulação de anticorpos ao fim de 6 a 12 meses e exame físico (Solano-Gallego, 2011).

Esta complexidade observada no diagnóstico da infeção por *L. infantum* é uma questão pertinente quando se considera a mobilização de animais de zonas endémicas para zonas não endémicas (Baneth, 2008; Noli & Saridomichelakis, 2014); a sua utilização como dadores de sangue; quando existe um

elemento do agregado familiar imunocomprometido em que a presença de flebótomos pode representar um risco de transmissão da infeção e na realização de estudos epidemiológicos e/ou de investigação (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Resultados seronegativos em cães assintomáticos, que vivem em zonas endémicas, devem ser interpretados com precaução e complementados, quando necessário, com técnicas moleculares em sangue, tecidos ou zaragatoas conjuntivais (Pennisi, 2015; Lombardo *et al.*, 2012; Solano-Gallego *et al.*, 2011). Estudos citados por Athanasiou, Kontos, Saridomichelakis, Rallis & Diakou (2012) confirmam que animais infetados, serologicamente negativos, podem ter resultado PCR positivo. O rastreio serológico destas populações de cães reflete-se numa subestimativa da taxa real de infeção, mesmo quando se definem limiares de positividade baixos (Leontides *et al.*, 2002; Oliva *et al.*, 2006).

No presente estudo apenas 3,3% (2/60) dos soros foram positivos, seroprevalência ligeiramente superior à da obtida por Vidal (2013) com 1,6 % (2/129) em cães de funções militares e policiais de todo o território nacional. Embora a irregularidade da profilaxia aplicada nos cães de caça se tenha refletido na elevada seroprevalência e evidência de exposição a agentes de doenças caninas transmitidos por carraças, não teve o mesmo impacto na infeção por *Leishmania*. A baixa percentagem de animais seropositivos para *L. infantum* 3,3% (2/60) neste estudo foi um resultado inesperado, visto que o concelho de Loures está inserido numa zona endémica (Cortes *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2010) e no dia a dia das consultas a que autora assistiu, no CAMV “Tojalvet”, foi possível observar inúmeros cães com LCan residentes na zona. A autora estimou cerca de dois novos casos de LCan diagnosticados por semana. No entanto, um estudo elaborado por Sousa *et al.*, (2011) reportou uma maior seroprevalência de infeção por *Leishmania* em animais a viver em meio urbano do que em meio rural, relacionada provavelmente com a proliferação de flebótomos em jardins e micro habitats que permitem o desenvolvimento de elevada densidade destes vetores e, consequentemente, aumentam o risco de infeção (Ximenes *et al.*, 2006) citado por Sousa *et al.*, (2011). Os cães do presente estudo viviam em canis de cimento com meio envolvente urbano e suburbano, fator que parece não ter contribuído para uma maior taxa de infeção.

Um dos soros com resultado positivo pertencia a uma cadela Podengo Português de cinco anos e o outro pertencia a uma cadela cruzada de Beagle de seis anos. É de sublinhar que a cadela com cinco anos, apresentou, no dia da colheita, uma diarreia ligeira e a cadela com seis anos não apresentou alterações no estado geral detetáveis no momento da recolha. Ambas as cadelas encontravam-se numa faixa etária associada a baixa prevalência de infeção, pois as faixas etárias de idade inferior aos três anos e entre os oito e os dez anos de idade, são as de maior prevalência de infeção segundo Paltrinieri *et al.* (2010) e Solano-Gallego *et al.* (2009). No entanto, Santos (2014) e Cortes *et al.* (2012) também reportaram maior seroprevalência em animais com idades compreendidas entre os cinco e os oito anos. Os cães com idade superior a seis anos e seronegativos, presentes no estudo, podem ter usufruído de resistência intrínseca de origem genética ou desenvolvido imunidade protetora com o passar dos anos

a viver numa zona endémica (Athanasίου *et al.*, 2012) ou, de acordo com alguns autores, já não possuírem competência imunitária para a produção de Ac (Santos, 2014).

Os cães mais novos, naturalmente têm menor tempo de exposição aos vetores, o que pode contribuir para a ausência de seropositividade.

Se a diarreia ligeira observada na Podengo Português de cinco anos estava relacionada com a infeção por *L. infantum* ou com outra circunstância ou afeção, não foi possível apurar. A LCan pode, esporadicamente, provocar colite ulcerativa e originar diarreia ocasional a frequente, um dos sinais clínicos observados em cães suspeitos de estarem infetados por *Leishmania* (Bourdeau *et al.*, 2014). O proprietário da cadela referiu que a tinha adquirido há sensivelmente um mês e que desconhecia as condições em que esta vivia anteriormente e se tinha recebido algum tipo de tratamento inseticida ou repelente nos meses anteriores, assim como desconhecia o seu historial clínico.

Sublinha-se a importância da realização de análises hematológicas, bioquímicas (incluindo proteinograma) e urianálise (nomeadamente o rácio proteína/creatinina na urina), para avaliar o estado de saúde dos animais e detetar alterações dos valores fisiológicos que possam suportar a evidência de suspeita clínica de LCan (Baneth *et al.*, 2008; Noli & Saridomichelakis, 2014; Solano-Gallego *et al.*, 2011).

As raças representadas neste estudo são tradicionalmente utilizadas na caça, sujeitas à seleção natural no decorrer da sua evolução. Estas raças, utilizadas há muitos anos na caça, uma atividade silvestre e de tão elevado risco de exposição, parecem ser menos predispostas a desenvolver doença, e apresentam frequentemente um reduzido nível de anticorpos, permanecendo seronegativos embora possam de fato, estar infetados (Solano-Gallego *et al.*, 2000).

Nas Ilhas Baleares, Solano-Gallego *et al.* (2000) associaram a eficaz resposta imunitária celular, do cão de raça Podengo de Ibiza, à resistência intrínseca na infeção por *L. infantum*, reflectindo-se num reduzido número de casos clínicos da doença em relação a outras raças presentes nas ilhas, uma zona altamente endémica. Sendo o Podengo de Ibiza uma raça instalada nas Ilhas Baleares há pelo menos 2000 anos, está perfeitamente adaptada ao clima, sob pressão da seleção natural para os alelos responsáveis por uma eficaz resposta imunitária, com subsequente controlo da infeção e sobrevivência dos indivíduos relativamente a parasitoses presentes no seu habitat. Estima-se que esta seleção terá promovido uma população resistente à infeção por *Leishmania infantum*. Na verdade, o Podengo Português é igualmente uma raça autóctone com muitos anos de existência, estando por este motivo bem adaptada à infeção por *L. infantum*, demonstrando menos casos de doença clínica em comparação com outras raças, nomeadamente as importadas. Um estudo reportado por Pereira da Fonseca *et al.* (2007) permitiu concluir que as raças nacionais são mais resistentes do que as raças importadas, sendo estas mais suscetíveis à infeção por *L. infantum*. Entre as raças importadas destacam-se as seguintes: o Boxer, o Pastor Alemão, o Rottweiler e o Cocker Spaniel (Pereira da Fonseca *et al.*, 2007; Solano-Gallego, 2011).

Estudos recentes em populações de cães errantes situadas no Centro do país reportaram seroprevalências elevadas para a infeção por *L. infantum*, Santos (2014) detetou 28,75% (23/80) no concelho de Vila Franca de Xira, e Silva (2011) detetou 16,25% (13/80) em Setúbal. Em ambos os estudos a população era composta por cães que em algum momento da sua vida estiveram expostos a vetores e a carências nutricionais, sem acesso a profilaxia adequada, fatores agravantes na deterioração do seu estado geral de saúde, predispondo para uma resposta imunitária celular insuficiente com consequente desenvolvimento da doença e níveis de anticorpos detetáveis (Baneth *et al.*, 2008; Miró *et al.*, 2008).

Vidal (2013) detetou uma seroprevalência inferior à obtida neste estudo, com 1,6% (2/129) de infeção por *L. infantum* em cães com funções militares e policiais que, tal como os cães de caça, deslocam-se e permanecem no exterior durante longos períodos e são expostos a ambientes silvestres e a outros cães. Apesar disso, a profilaxia era instituída segundo padrões gerais definidos pelos serviços veterinários da GNR e o suporte nutricional disponível era de alta qualidade.

Cortes *et al.* (2012) realizaram um estudo epidemiológico nacional em 2009 e reportaram que zonas anteriormente consideradas endémicas (Campino *et al.*, 2006) têm vindo a diminuir a sua seroprevalência e que novos focos endémicos têm surgido no interior do país, provavelmente devido ao esforço continuado dos Médicos Veterinários e proprietários no sentido de se detetar a LCan mais precocemente, tratar e aplicar medidas profiláticas para diminuir a exposição dos cães aos vetores infetados por *Leishmania infantum*.

Não se observou significância estatística entre o tipo de pelo e a presença ou ausência de infeção, ou seja, o tipo de pelo não foi um fator determinante na infeção por *Leishmania* spp. Os flebótomos parecem preferir picar zonas glabras ou com pouco pelo, como o focinho e as orelhas, pelo que o comprimento do pelo é irrelevante para a ocorrência de picadas de insetos (Killick-Kendrick & Killick-Kendrick, 1999) citado por Athanasiou *et al.* (2012).

Não foi possível realizar PCR para pesquisa de *L. infantum* neste estudo, que se poderia reflectir numa prevalência mais elevada e fidedigna dos animais assintomáticos infetados (Cardoso *et al.*, 2010).

Segundo as diretrizes do Grupo LeishVet, o tratamento de animais seropositivos assintomáticos não é recomendado. Estes devem ser monitorizados a cada 3 a 6 meses através de exame físico, testes laboratoriais e repetição das análises serológicas. Os seronegativos deverão ser monitorizados através de exame físico e análises serológicas a cada 6 a 12 meses (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Tratando-se de uma zona endémica, esta população de cães de caça deve seguir as recomendações do Grupo LeishVet (Solano-Gallego *et al.*, 2011) para a vigilância do seu estatuto como hospedeiros reservatório e sentinela. O maior obstáculo é o elevado investimento relacionado com esta prática, não sendo uma opção para a maioria dos proprietários destes cães.

Molina *et al.* (1994), citados por Otranto & Dantas-Torres (2013), descreveram a potencial infetividade de cães assintomáticos para os flebótomos, assim como Moshfe *et al.* (2009) provando que estes possuem igual potencial de infetividade para os vetores. Outros estudos realizados nos EUA

e na Europa, sugerem que animais sintomáticos têm maior capacidade para infetar os flebótomos, devido à imunossupressão observada durante a evolução da LCan (Dantas-Torres *et al.*, 2012b).

A profilaxia individual nos cães sintomáticos e assintomáticos é fundamental (Noli & Saridomichelakis, 2014), especialmente durante a época de transmissão da infeção, entre finais de maio e meados de outubro, a fim de evitar a infeção dos vetores e a infeção ou reinfeção dos cães. O controlo dos vetores é complexo e difícil devido ao vasto leque de micro habitats que os flebótomos ocupam, tornando-se muitas vezes impraticável o controlo ambiental dos vetores em zonas rurais e de grandes dimensões (Otranto & Dantas-Torres, 2013).

A não aplicação de inseticidas aumenta 1,5 vezes o risco de infeção por *L. infantum* em cães que vivem em zonas do interior e que permaneçam no exterior das habitações (Cortes *et al.*, 2012).

É evidente a necessidade de apostar na proteção individual dos cães de caça, através de inseticidas e repelentes, disponíveis em coleiras impregnadas, unções punctiformes e contínuas, assim como investir na otimização da resposta imunitária celular através da administração de imunomoduladores, como a domperidona (Gómez-Ochoa *et al.*, 2009; Sabaté *et al.*, 2014) e a administração de vacinas licenciadas para a proteção ativa durante todo o ano (Sousa *et al.*, 2011).

4.3.4 *Rickettsia conorii*

As riquetsioses são uma zoonose endémica nos países da bacia do Mediterrâneo e no sul da Europa incluindo Portugal, sendo a principal doença associada a ixodídeos (Cascio & Iaria, 2006; Portillo, Santibáñez, García-Álvarez, Palomar & Oteo, 2015; Santos-Silva *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2006; Solano-Gallego *et al.*, 2015).

O vetor de *R. conorii* é o ixodídeo *R. sanguineus*, um vetor endofílico, capaz de sobreviver o ano inteiro em microclimas do meio urbano, suburbano e rural, como canis, jardins e casas (Dantas-Torres, 2010; Gray *et al.*, 2013; Solano-Gallego *et al.*, 2015).

Visto que os cães estudados nesta dissertação viviam em canis comuns ou contíguos, com meio envolvente urbano e suburbano, a probabilidade de serem infetados por este agente era alta.

Neste estudo foram detetados 90% (54/60) de animais positivos por IFI. Santos (2014) também detetou uma elevada prevalência em cães errantes no concelho de Vila Franca de Xira com 76,2% (61/80) de seropositivos, Caeiros (2012) em Lisboa detetou 55% (44/80) de seropositividade, Figueiredo (2008) em Bragança detetou 35% (23/26), Alexandre (2011) detetou 38,5% (154/400) em cães assintomáticos no Algarve e valores mais baixos foram encontrados por Silva (2011) em Setúbal, com 23,75% (19/80) .

A elevada seroprevalência detetada no presente estudo sugere que há uma grande exposição ao vetor e ao agente, provavelmente associada ao quadro geralmente inespecífico da doença e à grande prevalência de *R. sanguineus* em Portugal (Santos-Silva *et al.*, 2011). Geralmente a infeção por *R. conorii* é assintomática, subclínica e por vezes autolimitante, havendo poucos casos clínicos graves atribuídos à doença, promovendo o seu subdiagnóstico, sendo por isso uma doença que existe de

forma insidiosa entre os cães domésticos (Levin *et al.*, 2012; Solano-Gallego *et al.*, 2006). Igualmente importante é a forma de transmissão entre ixodídeos após uma só refeição hematófaga no hospedeiro. Esta pode ser transestadial, transovárica (Greene *et al.*, 2012) e ocorrer durante a ação de *cofeeding* no hospedeiro, o que facilita a infecção direta de outras carraças, incluindo formas larvares e adultas, sem estas picarem um cão infetado (Brouqui *et al.*, 2007).

A infecção do Homem por *Rickettsia conorii* provoca a Febre Escaro-Nodular (Mencke, 2013) e é uma das zoonoses com maior importância na saúde pública na Europa, sendo considerada reemergente desde a sua descoberta (Chomel, 2011). Apesar do carácter geralmente benigno e autolimitante desta doença, o quadro clínico pode ser abrupto e os sinais clínicos incluem alterações gastrointestinais, cefaleias, mialgias, artralgias e prostração acentuadas (Silva *et al.*, 2006). Quadros clínicos mais graves incluem sinais clínicos neurológicos e envolvimento de vários órgãos. A taxa de mortalidade estimada ronda os 3 a 7% em pacientes hospitalizados, sendo que os fatores de risco associados à gravidade da doença incluem idade sénior, doenças concomitantes, imunossupressão e terapêutica anterior inadequada (Brouqui *et al.*, 2007; Duque *et al.*, 2012; Louro *et al.*, 2005).

Em países do sul da Europa é possível correlacionar a percentagem de animais seropositivos a *R. conorii* e a quantidade de casos de FEN no Homem, estimando-se uma seroprevalência de 26% a 60% em cães que residem em zonas endémicas para esta zoonose (Solano-Gallego *et al.*, 2006). Em Portugal registou-se uma das maiores taxas de incidência desta doença (Louro *et al.*, 2005; Sousa, Nóbrega, Bacellar & Torgal, 2003) assim como na cidade de Sicília, em Itália (Cascio & Iaria, 2006; Solano-Gallego *et al.*, 2015).

Note-se que *R. sanguineus* tem sido uma das carraças mais frequentemente retiradas de humanos em Portugal (Santos-Silva *et al.*, 2011). O aumento do número de carraças removidas de hospedeiros humanos no âmbito do programa REVIVE (Rede de vigilância de vetores) em Portugal, entre 2008 e 2014, tem sido significativo e revela a importância da identificação destes espécimes e da sua capacidade vetorial para informação atempada aos clínicos de prováveis casos de doença no Homem. A espécie mais abundante identificada nos últimos anos foi *Rhipicephalus sanguineus* e a pesquisa de agentes patogénicos nas carraças permitiu identificar 258 carraças positivas para oito espécies diferentes de *Rickettsia* spp. incluindo *R. conorii* (Alves *et al.*, 2014).

Devido à elevada exposição dos cães a *Rhipicephalus sanguineus*, estes têm sido utilizados em estudos epidemiológicos como espécie sentinela para as Riquetsioses humanas (Solano-Gallego *et al.*, 2015).

O elevado risco zoonótico de contrair FEN verifica-se principalmente durante o verão quando a atividade do vetor é máxima (Dantas-Torres, 2010; Louro *et al.*, 2005) e quando existe maior contato do Homem com carraças infetadas aquando da sua remoção dos cães (Greene *et al.*, 2012; Solano-Gallego *et al.*, 2015).

Estes dados indicam que é importante detetar e identificar as espécies e subespécies envolvidas em animais seropositivos através de PCR (Greene *et al.*, 2012) assim como educar e sensibilizar as pessoas para o risco do contato com carraças potencialmente infetadas. Deve-se evitar o contato com

tecidos ou fluídos de carraças esmagadas, através da utilização de luvas ou pinças para a correta remoção das carraças (Dantas-Torres & Figueredo, 2006; Dantas-Torres, 2008).

Embora o cão não transmita *R. conorii* diretamente ao Homem, a sua capacidade como hospedeiro reservatório aumenta o risco de transmissão acidental desta infeção. Desta forma o cão atua como espécie sentinela na epidemiologia da FEN (Alexandre *et al.*, 2011; Harrus *et al.*, 2007; Mencke, 2013).

Na ausência de vacina para a proteção contra da FBC, a melhor prevenção da doença passa por evitar zonas infestadas com ixodídeos e inspecionar os cães com regularidade.

4.4 Detecção de anticorpos pela técnica ELISA

4.4.1 *Babesia* spp.

A observação de esfregaços de sangue continua a ser o método de mais fácil execução, elevada especificidade e baixo custo para a maioria dos Médicos Veterinários na pesquisa de infeção por *Babesia* spp. na fase aguda da doença, durante a qual se verificam níveis moderados a altos de parasitémia, particularmente quando o hospedeiro apresenta pirexia. Este é o momento de maior probabilidade de detetar merozoítos intraeritrocitários (Dantas-Torres & Figueredo, 2006; Rodrigues, 2014).

Nas infeções subclínicas e crónicas, a parasitémia é baixa e intermitente, representando um desafio na deteção em esfregaços, resultando muitas vezes em falsos negativos (Irwin, 2009; Solano-Gallego, 2011). Por este motivo é recomendado utilizar a PCR, técnica esta que deteta quantidades reduzidas de ADN do parasita e é extremamente útil na identificação das espécies presentes (Duarte *et al.*, 2008; Simões *et al.*, 2011; Solano-Gallego & Baneth, 2011).

Nas técnicas serológicas para a deteção de Ac anti-*Babesia* spp. observa-se a ocorrência de reações cruzadas dentro do mesmo género, isto é, entre as espécies *B. canis*, *B. vogeli* e *B. rossi* (Irwin, 2009). Em animais muito jovens ou em quadros agudos da doença, os métodos serológicos podem originar falsos negativos devido ao número reduzido de Ac produzidos, recomendando-se a medição de Ac na fase de convalescença para confirmação de infeção ativa (Birkenheuer, 2012; Solano-Gallego, 2011). Outra limitação destes métodos é a dificuldade na interpretação dos resultados em zonas endémicas de Babesiose Canina (Irwin, 2009).

A IFI é a técnica serológica mais comum em estudos epidemiológicos, apesar das reações cruzadas que possam ocorrer entre as diferentes espécies de *Babesia* spp. (Santos, 2014; Caeiros, 2012; Silva, 2011; Vidal, 2013; Trapp, Dagnone, Vidotto, Freire, Amude & Morais, 2006). Devido a condicionantes logísticas, a autora optou pela técnica de ELISA, um método serológico igualmente bastante sensível (Furuta, Oliveira, Teixeira, Rocha, Machado & Tinucci-Costa, 2009; Irwin, 2009). Segundo uma comunicação pessoal da Eurovet (empresa fornecedora do teste BABESIA ELISA-DOG utilizado neste estudo) a 4 de maio de 2015, o teste permite a deteção de Ac anti- *Babesia canis*, ainda

considerada pelo fabricante como a única espécie de grandes babésias, não distinguindo as espécies *B. canis*, *B. vogeli* e *B. rossi* (antigamente designadas subespécies). Uma vez que não foi possível, por este método de diagnóstico, distinguir as espécies de *Babesia*, os dados obtidos foram interpretados como referentes à deteção de Ac anti- *Babesia* spp..

Na deteção de Ac anti-*Babesia* spp., a técnica de ELISA permitiu detetar 23,3% (14/60) soros positivos e 3,3% (2/60) duvidosos. Dos 14 soros positivos, 10 recebiam profilaxia através de pulverizações com fipronil.

Os resultados obtidos sugerem que as pulverizações podem ter sido instituídas de forma irregular, incorreta ou com doses abaixo das recomendadas, diminuindo a sua máxima eficácia (Dantas-Torres, 2008; Merial, 2013). A curta atividade residual dos compostos presentes nas pulverizações (Otranto Dantas-Torres, 2013) pode igualmente contribuir para se observar maior número de infeções, relacionadas com contato prévio com os vetores.

Os restantes quatro soros positivos pertenciam a animais que recebiam banhos acaricidas caso se detetassem ectoparasitas no seu pelo. Os dois resultados duvidosos representam 3,3% (2/60) do grupo estudado e a repetição do teste após quatro a seis semanas seria importante. Os resultados duvidosos podem indicar início da infeção por *Babesia* spp. ou uma reação imunitária inespecífica a outra doença ou parasita presente.

Os dados disponíveis sobre a deteção de *Babesia* spp. em cães, pela técnica ELISA, são escassos. De acordo com prevalências obtidas por outros autores, através de IFI, o resultado obtido neste estudo é próximo do obtido por Caeiros (2012) na zona de Lisboa, com 17,5% (14/80) e por Silva (2011) em Setúbal com 20% (16/80). Já Santos (2014) em Vila Franca de Xira detetou uma elevada prevalência em animais errantes com 57,5% (46/80), assim como Ferreira (2008) com 60,9% (14/24) em animais com DCTV atendidos no Hospital Escolar da FMV-UL.

Os cães de caça são animais com maior risco de infeção por *Babesia* spp. devido à sua elevada exposição a ixodídeos (Cacciò *et al.*, 2002; Irwin, 2009).

A intermitente e baixa parasitémia observada em infeções crónicas por *Babesia* spp. (Solano-Gallego & Baneth, 2011) pode justificar a baixa prevalência reportada neste estudo.

Em Portugal, *B. canis* estima-se endémica no Norte do país e *B. vogeli*, apesar de não ser endémica, já foi identificada na mesma região (Cardoso *et al.*, 2008; Cardoso *et al.*, 2010; Rodrigues, 2014). No Centro tem-se observado a deteção de Ac anti- *Babesia* spp., sem confirmação da espécie por técnicas moleculares e as prevalências observadas sugerem que a identificação da espécie pode ser fundamental para entender os quadros clínicos que surjam ao longo do ano.

A altura de maior atividade de *R. sanguineus* acontece entre a primavera e o outono (Sainz *et al.*, 2015; Harrus *et al.*, 2012) observando-se nesta época um aumento dos casos de BC por *B. vogeli*. Já o ixodídeo *D. reticulatus* é mais ativo entre o outono e a primavera, observando-se mais casos de BC por *B. canis* durante esta época do ano (Cardoso *et al.*, 2010; Solano-Gallego *et al.*, 2008).

A transmissão de *Babesia* spp. pode ocorrer de forma transovárica ou transestadial, sendo a infecção transferida para a geração seguinte de carraças mesmo na ausência de cães infetados (Schnittger *et al.*, 2012). Desta forma não é necessário o contato com cães infetados para a manutenção de infecção por *B. vogeli* numa população de carraças (Trapp *et al.*, 2006).

A convivência entre vários cães durante as viagens e a atividade da caça facilita o transporte de carraças infetadas por cães saudáveis, de volta para os seus locais de descanso e habitação. A transmissão transovárica de *Babesia* spp. entre os ixodídeos *R. sanguineus* realça a importância da prevenção e tratamentos acaricidas para a erradicação deste vetor em cães que coabitam.

A deteção de carraças *R. sanguineus* e *D. reticulatus* em diferentes distritos de Portugal, infetadas com as espécies *B. vogeli* e *B. canis* respetivamente (Maia *et al.*, 2014), e a presença destes ectoparasitas em cães de caça na região de Bragança (Figueiredo, 2008) assim como em cães errantes em Vila Franca de Xira (Santos, 2014) sugere a presença de *B. vogeli* e *B. canis* no Centro do país. Dado que a caça movimenta cães de Norte a Sul do país, quer pela atividade em si quer pelas transações destes animais entre diferentes proprietários, é altamente provável a infecção destes cães por *Babesia* spp, portanto a especiação através de técnicas moleculares seria um importante complemento.

A maior quantidade de casos clínicos reportados que implicam *B. canis* podem estar relacionados com a maior virulência desta espécie, originando um quadro clínico mais grave, típico da BC, aumentando a necessidade de recorrer a um Médico Veterinário (Cardoso *et al.*, 2010).

Segundo o estudo de Rodrigues (2014), em alguns cães com aptidão para caça, os sinais clínicos compatíveis com BC tornavam-se evidentes para o dono no final do dia de caça e/ou 24 horas depois. Portanto, alguns cães podem ser portadores assintomáticos de *B. canis* e podem, após exercício físico intenso ou tratamentos imunossupressores (por exemplo com corticosteróides), manifestar sinais clínicos da doença.

B. vogeli tende a induzir um quadro clínico mais ligeiro e heterogéneo nos cães infetados, por essa razão torna-se menos comum a ida destes animais ao veterinário mas ao mesmo tempo torna-se mais complexo para o Médico Veterinário associar a infecção de *B. vogeli* com a BC (Solano-Gallego *et al.*, 2008). Desta forma se considera que a verdadeira prevalência da infecção por *B. vogeli* pode estar subestimada (Cardoso *et al.*, 2010) e a prevalência de *B. canis* em Portugal e em alguns países da Europa considerados endémicos, possa estar sobrestimada.

Tendo em conta que o tratamento da BC difere da terapêutica utilizada em infeções por outros agentes transmitidos por carraças, torna-se importante identificar a presença e distribuição de *B. vogeli* e *B. canis* no Centro do país e reconhecê-las como agentes importantes a ter em consideração quando se observam quadros clínicos complicados em animais suspeitos de DCTV. De salientar ainda que, em quase 1/3 dos cães observados no estudo de Rodrigues (2014) o único sinal clínico relatado pelos donos era a apatia e letargia, daí que seja importante incluir a BC nos diagnósticos diferenciais de cães que se apresentem à consulta com prostração aguda, no período entre o outono e a primavera.

A técnica de PCR também pode ser influenciada pela baixa e intermitente parasitemia nas infecções assintomáticas e/ou crônicas (Irwin, 2009; Solano-Gallego & Baneth, 2011). Compreende-se que na detecção e identificação das espécies de *Babesia* spp. seja importante utilizar a PCR associada a técnicas serológicas, em mais do que uma recolha, para o mesmo animal.

A crescente mobilização de cães promove a circulação e transmissão de agentes de DCTV, incluindo as babesias, e a sua disseminação para áreas geográficas onde até recentemente não eram consideradas endêmicas. Devido à diferente virulência observada nas diferentes espécies de babesias que infetam os cães, a obtenção da prevalência regional destes agentes é importante para o diagnóstico e manejo individual de cada caso clínico suspeito de BC (Simões *et al.*, 2011).

4.5 Detecção de microfilárias pela Técnica de Knott modificada e detecção de Ag de *D. immitis*

A detecção de microfilárias pode ser feita com recurso à técnica de Knott modificada e/ou observação de uma gota fresca de sangue capilar ao microscópio ótico (AHS, 2014). Por motivos logísticos dos locais de recolha, não foi possível realizar exame de gota fresca de sangue capilar no presente estudo.

As microfilárias detetadas pelas técnicas acima referidas carecem de identificação da espécie, sendo este passo fundamental no diagnóstico diferencial de microfilarémia provocada por filarídeos patogénicos como *D. immitis* e *D. repens* (ESCCAP, 2012; Otranto *et al.*, 2013; Rinaldi *et al.*, 2013) e por filarídeos de menor significado clínico como *Acanthocheyletonema reconditum*, *A. dracunculoides* (Magnis *et al.*, 2013) e *Cercopithifilaria* sp. (Otranto *et al.*, 2011; Otranto *et al.*, 2012). A diferenciação das diferentes microfilárias pode ser realizada através do padrão de distribuição da fosfatase ácida, avaliação morfométrica, detecção de antígeno de *D. immitis*, e mais especificamente, através de PCR (Alho *et al.*, 2014; Magnis *et al.*, 2013; Nelson, 2012; Rinaldi *et al.*, 2013; Rishniw, Barr, Simpson, Frongillo, Franz & Alpizar, 2006). A distinção das espécies através da observação das características morfológicas das extremidades requer experiência e a adição da formalina a 2% durante a execução da técnica de Knott pode induzir artefatos que alteram a conformação da cauda (Traversa *et al.*, 2010).

De acordo com Bowman (2003); Magnis *et al.* (2013) e Nelson (2012) os resultados obtidos da observação das preparações obtidas sugerem que alguns animais se encontravam parasitados pelas espécies *A. reconditum* e *D. immitis*. Estes resultados deveriam ser complementados com técnicas moleculares para a sua especiação. Estudos epidemiológicos consideram que *A. reconditum* é o filarídeo mais prevalente em toda a Europa (Otranto *et al.*, 2013), no entanto o aparecimento de novas espécies alerta para a alteração de focos endémicos e das prevalências reportadas.

É de salientar que a detecção de microfilárias depende da sua presença no sangue circulante e em quantidade suficiente, observando-se uma variação diária na quantidade de microfilárias em circulação, sendo maior ao final do dia, altura em que se verifica maior atividade dos vetores, contudo apenas 5% a 20% do número total de microfilárias é que se encontram em circulação e não existe correlação direta entre o número total destas e a quantidade de adultos na artéria pulmonar (Bowman,

2009). De igual importância é de referir a baixa sensibilidade (38%) da técnica de Knott (Wang, 1997). Estima-se que 10 a 67% das infecções não demonstram microfilarémia devido à resposta imunitária do hospedeiro que limita a presença das microfilárias à microcirculação pulmonar, resultando na formação de inflamação granulomatosa nos pulmões e pneumonia eosinofílica (Calvert & Ridge, 2006).

A prevalência de sangues microfilarémicos detetados neste estudo, através da técnica de Knott modificada, foi 20% (12/60). Semelhante prevalência foi encontrada por Santos (2014) com 21,25% (17/80) numa população de cães errantes no concelho de Vila Franca de Xira. Uma menor prevalência foi reportada por Félix (2015) com microfilárias detetadas em 2,7% (7/264) dos sangues provenientes de cães de canil de Norte a Sul do país.

A ausência de microfilárias através da realização da técnica de Knott modificada não exclui a infeção. Da mesma forma, a deteção de microfilárias não é exclusiva do diagnóstico de infeção por adultos de *D. immitis*, podendo tratar-se inclusive de infeção por outras espécies de filarídeos. De fato, até 30% dos cães amicrofilarémicos podem albergar formas adultas, devido à infeção por adultos do mesmo sexo (raro), eficaz resposta imunitária do hospedeiro, administração de fármacos microfilaricidas (Venco, 2007) ou por se encontrarem ainda no período pré-patente (AHS, 2014).

Devido a condicionantes logísticas, neste estudo apenas sangues com microfilárias foram submetidos a pesquisa de antígeno pelo teste WITNESS® Dirofilaria. Os testes atualmente utilizados na deteção de antígenos são bastante sensíveis e específicos (AHS, 2014).

O resultado negativo na deteção de Ag de *D. immitis* nas amostras de sangue com microfilárias, detetadas pela técnica de Knott pode dever-se às seguintes situações: microfilárias de outra espécie; nível muito baixo de Ag de *D. immitis* em circulação (infeção por 1 ou 2 fêmeas: o teste baseia-se na deteção de uma proteína presente no ovário da fêmea); adultos de *D. immitis* mortos com Ag eliminado mas microfilárias ainda em circulação; contaminação dos sangues durante o processamento; transfusão sanguínea de outro animal com microfilárias; transferência pré-natal de microfilárias; eliminação do Ag devido à formação de imunocomplexos ; destruição do Ag devido a armazenamento ou tratamento incorreto da amostra (Cornell University College of Veterinary Medicine, 2014; Little *et al.*, 2014; Traversa, Cesare & Conboy, 2010).

Os restantes animais 48/60, apesar de negativos pela técnica de Knott modificada, poderiam albergar infeções ocultas por adultos. Segundo Félix (2015) a realização simultânea da técnica de Knott modificada e do teste rápido por imunocromatografia aumenta a sensibilidade na deteção de infeção por *D. immitis*.

A ausência de microfilárias pode resultar de infeção ainda na fase pré-patente (<5 meses), uma eficaz resposta imunitária que inibe a reprodução nos adultos ou a infeção só com um sexo, podendo estes animais meses mais tarde, desenvolver microfilarémia e sinais clínicos da doença (AHS, 2012; Bowman, 2009; Nelson, 2012). Salienta-se o uso popular de ivermectinas na desparasitação dos animais e no tratamento de sarnas, situação que pode potenciar a ausência de microfilárias em alguns

animais que possam estar infetados com adultos. Na presença de infeções mistas, a distinção das espécies através de PCR é imperativa, já que é expectável a disseminação de novas espécies de microfilárias na Europa (Morchón *et al.*, 2012; Otranto *et al.*, 2013). Destaca-se a deteção de um cão infetado por *D. repens* em Portugal, segundo Maia, Lorentz, Cardoso, Otranto & Naucke (2016).

No presente estudo, foi detetado apenas um animal (1,7%) com presença de antigénio de *D. immitis*: uma cadela de raça Beagle com seis anos, sem sinais clínicos ou alterações no comportamento observadas pelo proprietário. Apesar da confirmação da infeção por *D. immitis* pela deteção de Ag, esta cadela poderia albergar uma infeção mista com outra espécie de microfilárias, visto que no mesmo canil onde habitava, outros animais apresentaram microfilarémia (cujas medições sugeriram que se trata de *A. reconditum*) na técnica de Knott e o teste de deteção de Ag de *D. immitis* revelou resultado negativo.

Nestes casos recomenda-se o tratamento desta cadela e a reavaliação dos animais microfilarémicos com recurso a PCR ou repetição da deteção de Ag meses mais tarde, no sentido de identificar a espécie em causa e confirmar a presença ou ausência de *D. immitis*.

A baixa prevalência observada neste estudo, de 1,7% (1/60), foi próxima da obtida por Félix (2015) com 1,5% (4/264), resultado obtido em cães de canil assintomáticos. Estas prevalências contrastam com a maioria dos resultados obtidos em Portugal, Santos (2014) detetou uma prevalência de 12,2% (10/80) em Vila Franca de Xira; Maia, Coimbra, Ramos, Cristóvão, Cardoso & Campino (2015) reportaram 9,4% (16/170) no Algarve; Cardoso *et al.* (2012) obtiveram 2,4% (13/557) em Lisboa e 3,6% (20/557) no resto do país, em cães assintomáticos; Alho *et al.* (2014) com 15,1% (105/696) de prevalência global no Centro e Vieira *et al.* (2014) com 2,1% (8/386) a Norte e Centro. Uma das maiores prevalências até agora obtidas foi registada em Setúbal com 24,8% (25/101) (Alho *et al.*, 2014). Como Miró *et al.* (2013) demonstraram, num estudo realizado em Espanha, as prevalências de um grupo assintomático e sintomático foram 4,2% e 25,9% respetivamente, verificando-se claramente que animais sintomáticos têm tendência para maiores prevalências. A mesma tendência verificou-se quando Vieira *et al.* (2014) detetaram, em 386 cães, apenas 1% de infeção em animais assintomáticos e 5,2% em sintomáticos.

O presente estudo incidiu sobre animais assintomáticos e não se procedeu à testagem de todos os animais, logo não houve oportunidade de detetar infeções ocultas, o que pode estar relacionado com a baixa prevalência obtida. Para uma estimativa mais aproximada da realidade, esta infeção merece estudos mais amplos e completos no concelho de Loures.

No ciclo de vida deste parasita, a participação do gato e da raposa como hospedeiros reservatórios não é significativa, a carga parasitária é baixa e a sua resistência imunitária induz microfilarémia reduzida e de curta duração (Bowman, 2009; Otranto *et al.*, 2013). No entanto dados obtidos pela deteção de Ac anti- *D. immitis* em gatos domésticos, indicam uma elevada exposição dos gatos domésticos ao parasita com 15% (65/434) na zona centro e sul de Portugal (Vieira *et al.*, 2014) e deteção de Ag de *D. immitis* em 4,8% (13/271) a Sul, segundo estudos realizados por Maia *et al.* (2015).

Alho *et al.* (2014) estimaram que o risco de transmissão deste parasita é maior na Madeira e em Faro, estando Lisboa em terceiro lugar, onde o risco ocorre durante 6,4 meses do ano, fortalecendo assim a ideia de que Portugal é um país com capacidade de manutenção e disseminação de *D. immitis*. Com igual importância, Ferreira *et al.* (2015) identificaram espécies de mosquitos infetadas com *D. immitis* em várias zonas de Portugal, corroborando o estudo anterior.

Existe um aumento da mobilização de animais infetados oriundos de zonas endémicas, introdução de novas espécies de mosquitos e alterações climáticas que vão condicionar a distribuição de *D. immitis* (Vieira *et al.*, 2014).

As alterações climáticas observadas a nível mundial traduzem-se em épocas de verão mais quentes na Europa devido ao aumento da temperatura média. Esta alteração é benéfica à transmissão de *D. immitis* e ao aumento da época de transmissão do parasita (Morchón *et al.*, 2012; Otranto *et al.*, 2013) facilitando a disseminação da doença a zonas até agora consideradas não endémicas.

A identificação do mosquito *Aedes albopictus* a sul da Europa, um vetor competente de *D. immitis*, sugere que este irá disseminar-se até ao norte da Europa, tendo em consideração que o cão doméstico é um excelente reservatório para filarídeos (Otranto *et al.*, 2013). Esta alteração na distribuição do vetor e do agente, vai provocar alterações na epidemiologia da doença nos cães e no Homem (Genchi, Rinaldi, Mortarino, Genchi, Cringoli, 2009).

Em zonas de clima temperado com diminuição sazonal da temperatura, aconselha-se o rastreio da infeção no final da primavera (Calvert & Ridge, 2006).

5. CO-INFEÇÕES

A ocorrência de coinfeções é frequente em zonas onde os diferentes agentes de DCTV são endémicos, coexistindo geralmente, em simultâneo, uma alta densidade populacional de vetores (Otranto, Dantas-Torres & Breitschwerdt, 2009). Apesar das coinfeções serem um reflexo do estilo de vida dos cães de caça, pela sua prolongada exposição aos vetores, alguns agentes de DCTV interferem no sistema imunitário do hospedeiro e suprimem a eficaz resposta imunitária que tipicamente debelaria infeções por determinados organismos (Roura, 2007). O sinergismo da infeção por dois ou mais agentes pode induzir uma imunossupressão significativa, provocando alteração dos mecanismos fisiopatológicos da resposta imunitária, complicando a progressão natural da doença, alterando o tempo de incubação, as manifestações clínicas e o prognóstico individual de cada animal (Otranto, Dantas-Torres & Breitschwerdt, 2009).

Embora as coinfeções interfiram na imunidade do hospedeiro, é possível observar animais infetados sem sinais clínicos de doença (Ebani *et al.*, 2015), como se pode constatar na figura 13 (pág. 45), uma cadela cruzada de Beagle com infeção mista por *Mycoplasma* spp., *Ehrlichia canis* e *Rickettsia conorii*, que não demonstrava sinais clínicos evidentes de doença.

Neste estudo foram detetadas infeções mistas em 68,3% (41/60) das amostras recolhidas. Um valor superior a este foi reportado por Santos (2014) com 76,4% de coinfeções em animais errantes (sem quaisquer medidas profiláticas) no concelho de Vila Franca de Xira. Já Vidal (2013) efetuou um rastreio por DCTV em cães com funções militares e policiais e não detetou nenhum animal com infeções mistas.

Estes dados indicam que a profilaxia instituída nos cães com funções militares e policiais permitiu prevenir e diminuir o contato dos animais com vetores infetados. Considerando a semelhança dos ambientes silvestres em que os cães de caça e os das forças militares e policiais trabalham e se movimentam, torna-se evidente o impacto da irregularidade observada na aplicação de medidas profiláticas nos cães de caça.

A coinfeção com *E. canis* e *R. conorii*, agentes que partilham o mesmo vetor, foi a mais prevalente, tendo sido detetada em 11,7% (7/60) das amostras. No seu estudo com cães errantes em Vila Franca de Xira, Santos (2014) apenas reportou esta coinfeção em 2,5% (2/80) dos animais, provavelmente devido ao estado subnutrido, ausência de cuidados médicos ou profiláticos, infeções parasitárias concomitantes e à inadequada resposta imunitária que os cães errantes apresentavam, pelo que um maior número de cães evoluiu para um desfecho fatal no caso desta coinfeção, antes de terem a oportunidade de ser recolhidos pelo canil municipal.

A coinfeção com *E. canis*, *R. conorii* e *M. haemocanis* foi detetada em 5% (3/60) dos cães. Em outros estudos realizados para pesquisa de agentes de DCTV esta coinfeção não foi reportada. Nesta coinfeção também se identifica um vetor ixodídeo comum (*R. sanguineus*) aos agentes detetados (Cardoso *et al.*, 2010; Novacco *et al.*, 2010).

Em todas as coinfeções detetadas, o agente *R. conorii* estava presente, sugerindo que todos os cães estiveram expostos ao vetor *R. sanguineus*, um ixodídeo com uma ampla distribuição nas zonas subtropicais, tropicais e mediterrâneo, sendo enzoótico no sul da Europa (René-Martellet *et al.*, 2015). Este vetor também conta com o maior leque de hospedeiros e distribuição por todo o território nacional e Península Ibérica (Miró *et al.*, 2013; Santos-Silva *et al.*, 2011), sendo responsável pela transmissão de outros agentes como *E. canis*, *B. vogeli*, *B. canis*, *H. canis* e um vetor provável de *Anaplasma platys* e *Mycoplasma haemocanis* (Cardoso *et al.*, 2010; Gray, Dantas-Torres, Estrada-Peña & Levin, 2013; Otranto *et al.*, 2009).

A capacidade de *R. sanguineus* se instalar e sobreviver no meio urbano o ano inteiro (canis, jardins e dentro das habitações inclusive) representa um risco de infeção para animais e humanos (Uspensky & Ioffe-Uspensky, 2002; Sainz *et al.*, 2015), assim como as suas capacidades imunomoduladoras também promovem e facilitam a transmissão de vários agentes de DCTV (Chomel, 2011; Day, 2011).

A deteção de Ac anti-*Babesia* spp. sem a identificação da espécie, através de métodos moleculares, não permitiu concluir se as espécies envolvidas foram transmitidas por *R. sanguineus* ou *D. reticulatus*, com o envolvimento das espécies *B. vogeli* ou *B. canis*, respetivamente.

O vetor *D. reticulatus* tem elevada prevalência no Norte (Santos-Silva *et al.*, 2011), sugerindo a predominância da espécie *B. canis* também a Norte. Alguns estudos desenvolvidos no norte de Portugal detetaram maior prevalência de *Babesia canis* em cães suspeitos de Babesiose Canina. Cardoso *et al.* (2008) detetaram 87,5% (7/8) e Cardoso *et al.* (2010) detetaram 98% (44/45). Em ambos os estudos apenas um animal apresentava *B. vogeli*.

As coinfeções deste estudo que identificaram a presença de *Babesia* spp. em 25% (15/60) das amostras, demonstram a presença concomitante de *R. conorii*, um forte indicador de que o vetor poderá ser o mesmo e que se poderá tratar da espécie *B. vogeli*, no entanto estes resultados carecem da aplicação de técnicas moleculares para apurar a espécie presente.

Situação semelhante se observa na deteção de Ac anti-*A. phagocytophilum*. A reação cruzada com *A. platys* que pode ocorrer nos testes serológicos alerta para a necessidade de associar técnicas moleculares a estes estudos epidemiológicos (Miró *et al.*, 2013).

A ocorrência de coinfeções por *H. canis* e outros agentes é habitual, como por exemplo *E. canis*, *B. vogeli*, *B. canis* e *A. phagocytophilum* (Baneth, 2011; Caeiros, 2012).

À semelhança das observações de outros autores os agentes de DCTI carecem de mapeamento detalhado e a identificação por PCR das espécies de *Babesia* spp. e *Anaplasma* spp. presentes no território nacional (Cardoso *et al.*, 2008; Cardoso *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2009; Simões *et al.*, 2011). Apenas um cão foi detetado como portador de seis agentes de DCTV. Este animal apresentou resultado positivo para *L. infantum* na titulação 1:320, resultado positivo para as IFI de *E. canis* e *R. conorii*, resultado positivo na técnica de ELISA na pesquisa de Ac anti-*Babesia* spp. e demonstrou formas de gamontes de *H. canis* em neutrófilos no esfregaço sanguíneo.

Uma coinfeção com *L. infantum*, *Babesia* spp., *E. canis* e *Hepatozoon canis* foi reportada em apenas um cão num estudo desenvolvido por Otranto *et al.* (2010b). Esta prevalência demonstra o quão incomum é detetar um cão com este número de coinfeções. Um animal com diversas coinfeções incorre em maior risco de desenvolver quadro clínico grave com evolução fatal, devido a complicações provocadas pela agudização de infeções crónicas (Tommasi, Otranto, Dantas-Torres, Capelli, Breitschwerdt & Caprariis, 2013). Por esta razão não se observam muitos cães com indícios de serem portadores de mais de quatro coinfeções, sejam agudas, subclínicas ou crónicas. A cadela identificada com seis agentes de DCTV foi entretanto vendida e mudou de casa, acabando por morrer durante a execução deste estudo. Não foi possível recolher informação sobre a causa de morte e/ou a história clínica desta cadela.

Visto que os cães de caça são transacionados e mobilizados com muita frequência ao longo da sua vida útil, observa-se grande dificuldade em seguir os seus percursos geográficos e manter registos atualizados sobre a sua história clínica. Fica assim dificultado o acompanhamento médico veterinário no que diz respeito aos sinais clínicos, doenças e/ou infeções previamente diagnosticadas, o método de diagnóstico utilizado, o resultado deste, e as terapêuticas instituídas durante a vida do animal. Da

mesma forma é difícil obter dados sobre a profilaxia anteriormente aplicada em animais recentemente adquiridos.

Em conversas informais, alguns proprietários de cães de caça comentaram que ocasionalmente um ou outro cão demonstrava menos apetite durante dois a três dias, não sendo urgente a sua ida ao veterinário pois pareciam recuperar sem intervenção. Este tipo de situações podem indicar uma fase transitória de febre, anorexia e mau estar geral que alguns animais experimentavam no decorrer de alguma infecção por agentes de DCTV.

A elevada prevalência de Ac observada nos cães de caça deste estudo para infecções com pelo menos um agente (95%), contrasta com a prevalência obtida por Vidal (2013) em cães de forças militares e policiais em Portugal, onde apenas se detetou infecção por um agente em 6,2% (8/129) dos cães e não foram observadas coinfeções. Salienta-se que nestes cães a profilaxia era aplicada individualmente e os serviços veterinários da GNR têm um padrão geral de administração de anti-parasitários tópicos e orais, reforçada por um acompanhamento diário do militar em cada binómio, sobretudo no que respeita à infestação por carraças (Vidal, 2013).

A discrepância observada nas seroprevalências obtidas relaciona-se com as condições em que os cães de caça são mantidos (vários animais por canil e instalações contíguas), a irregularidade na aplicação de profilaxia individual e com o meio envolvente do habitat dos animais. Nos cães utilizados na atividade da caça a profilaxia tende a ser insuficiente e irregular (Rodrigues, 2014), sendo bastante comum a aplicação de banhos com amitraz apenas após a deteção dos ectoparasitas (Sainz, Tesouro, Rodriguez, Mayoral & Mazzucchelli, 1995).

A exposição às zonas rurais circundantes e o contato com outros cães é elevado e frequente, portanto a infestação por ixodídeos é quase inevitável. Nos cães do presente estudo, foram aplicadas pulverizações com fipronil em 45% dos animais e nos outros 55% foi aplicado banho acaricida com amitraz apenas após a observação de ectoparasitas. A fixação de ninfas nos cães, vulgarmente designadas por “chumbinho”, é bastante comum, já a sua visualização é difícil pelo seu reduzido tamanho, podendo passar despercebida uma infestação por formas juvenis de carraças, aumentando a probabilidade destas se propagarem aos restantes animais que partilham o mesmo canil ou em instalações contíguas.

Apesar da sua ampla distribuição, o ixodídeo *R. sanguineus* é maioritariamente encontrado em áreas urbanas e suburbanas, locais que permitem a sua manutenção em estreita associação com cães e humanos. Nestas áreas, as infestações costumam ser numerosas e graves, especialmente em locais com vários animais confinados que não são tratados sistematicamente com ectoparasiticidas. Portanto, uma densidade populacional elevada de cães promove o risco de infestação por ixodídeos, contrastando com as menores infestações detetadas em cães que vivem em zonas rurais (Dantas-Torres, 2010; Gray *et al.*, 2013).

Neste estudo observou-se uma maior proporção de animais com coinfeções em meio suburbano, 73,7% (42/57). O meio suburbano contempla zonas adjacentes aos canis com alguma vegetação, mais

propícias à manutenção de populações de artrópodes, pelo que existe uma maior facilidade de deslocação de ixodídeos da vegetação circundante para os canis destes cães, assim como se verifica a saída frequente dos animais em meio suburbano para as zonas rurais circundantes da sua habitação. Estes acontecimentos podem contribuir para uma maior prevalência de infeção em animais nesse meio, embora alguns vetores sobrevivam e se mantenham mais frequentemente no meio urbano, como *R. sanguineus* e os flébotomos (Ebani, Bertelloni, Torracca & Cerri, 2014; Sousa *et al.* (2011).

Durante a época de caça, cães provenientes de várias zonas do país convivem entre si durante várias horas e, por vezes, são transportados nos mesmos atrelados podendo inclusive pernoitar em canis alheios, fora de casa. Também se observa com frequência a movimentação de alguns machos para outros canis durante o cio de cadelas com interesse para a reprodução, ficando estes instalados durante alguns dias em canis que frequentemente se localizam em zonas distantes. Outros animais que coabitem com cães de caça estão em risco de contrair infeção por estes agentes de DCTV, assim existam vetores, sendo evidente a necessidade de aplicar medidas profiláticas a todos os animais.

Todas as situações anteriormente descritas representam um risco para a transmissão de ixodídeos entre cães de diferentes regiões (Dantas-Torres, 2010; Gray *et al.*, 2013).

Na deteção de infeção ou exposição a determinados agentes, o esquema de diagnóstico deve ser adaptado a cada animal, considerando-se a hipótese de que geralmente existem infecções mistas com outros agentes de DCTV (Solano-Gallego, 2011).

Cada técnica disponível para a deteção de infeção por DCTV tem limitações, sendo possível diminuir esta lacuna com a combinação de vários testes de modo a obter prevalências o mais aproximadas possível da realidade. Na deteção de infeção e ou exposição aos diferentes agentes de DCTV, observa-se um aumento de 4 a 58% na deteção destes agentes quando se associam técnicas serológicas e técnicas moleculares (Maggi *et al.*, 2014).

6. CONCLUSÃO

O estágio curricular no CAMV “Tojalvet” permitiu adquirir e desenvolver competências na área do atendimento Médico Veterinário ao público, na medicina interna, nas técnicas de diagnóstico, na técnica cirúrgica e na clínica de ambulatório.

A realização das diferentes técnicas no Laboratório de Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa foi fundamental na formação profissional da autora, no sentido de desenvolver prática na execução de protocolos e tarefas laboratoriais.

O desenvolvimento do tema e os resultados obtidos contribuíram para o conhecimento e estudo das DCTV em cães de caça em Portugal, permitindo também descrever o panorama parasitológico destes animais no concelho de Loures, área metropolitana de Lisboa. Foi igualmente importante identificar as prevalências de agentes transmitidos por vetores com potencial zoonótico.

Neste estudo foi detetada uma prevalência total de 95% (57/60) de infeções com pelo menos um agente de DCTV. As prevalências obtidas na deteção de infeção de cada parasita, pelas diferentes técnicas, foram: 3,3% para *Hepatozoon canis*, 16,7% para formas compatíveis com *Mycoplasma haemocanis*, 20,7% para microfilárias, 1,7% para *Dirofilaria immitis*, 20% para *Anaplasma phagocytophilum*, 23,3% para *Babesia* spp., 40% para *Ehrlichia canis*, 3,3% para *Leishmania infantum* e 90% para *Rickettsia conorii*. As elevadas seroprevalências obtidas na deteção de Ac anti-*R. conorii*, anti-*Babesia* spp., anti-*A. phagocytophilum* e anti-*E. canis* sugerem que Loures é endémica para estes agentes de doenças caninas transmitidos por vetores ixodídeos. Estes valores elevados parecem dever-se à irregularidade observada na profilaxia, no contato entre vários cães de diferentes zonas e ao ambiente rural em que decorre a atividade da caça.

Neste estudo verificou-se uma maior prevalência de DCTV por ixodídeos do que por culicídeos e/ou flebótomos. Apesar das elevadas prevalências registadas, os cães apresentavam-se assintomáticos, podendo constituir um reservatório de agentes zoonóticos para o Homem e outros animais. Destacou-se a bactéria *Rickettsia conorii*, o agente zoonótico da Febre Escaro Nodular, com uma seroprevalência elevada que alerta para o risco zoonótico a que estão expostas todas as pessoas que lidam com os cães de caça, desde os seus proprietários e tratadores, aos profissionais de Medicina Veterinária (médicos, enfermeiros e auxiliares).

Considera-se premente uma profilaxia adequada (tanto das instalações físicas como dos animais) e uma inspeção regular dos animais para a identificação de ectoparasitas, reduzindo consideravelmente a exposição dos cães aos vetores e agentes de DCTV.

Outros estudos seriam desejáveis para complementar o conhecimento destes agentes, como a especiação de *Babesia* spp., de *Anaplasma* spp. e de microfilárias por técnicas moleculares.

Os resultados do presente estudo indicam que é necessário aumentar o conhecimento dos proprietários sobre o risco zoonótico de agentes de DCTV e sensibilizar estes para um maior compromisso na profilaxia dos seus cães de caça. A prevenção da infeção é a melhor abordagem para gerir as DCTV.

BIBLIOGRAFIA

- Alexandre, N., Santos, A.S., Bacellar, F., Boinas, F.J., Nuncio, M.S. & De Sousa, R. (2011): Detection of *Rickettsia conorii* strains in Portuguese dogs (*Canis familiaris*). *Ticks and Tick-borne Diseases*, 2, 119-122.
- Alexandre, N., Santos, A.S., Nuncio, M.S., De Sousa, R., Boinas, F. & Bacellar, F. (2009): Detection of *Ehrlichia canis* by polymerase chain reaction in dogs from Portugal. *The Veterinary Journal*, 181, 343-344.
- Alho, A.M., Landum, M., Ferreira, C., Meireles, J., Gonçalves, L., Madeira de carvalho, L. & Belo, S. (2014): Prevalence and seasonal variations of canine dirofilariosis in Portugal. *Veterinary Parasitology*, 206, 99-105.
- Alho, A.M., Nunes, T., Rinaldi, L., Meifreles, J., Belo, S., Deplazes, P. & Madeira de Carvalho, L. (2014): Transmission risk of Dirofilariosis in Portugal. *Parasites & Vectors*, 7(Suppl 1):O16.
- Afonso, M.O. & Alves-Pires, C. (2008). Bioecologia dos vectores. In Santos-Gomes, G., & Pereira da Fonseca, I. *Leishmaniose Canina*. (pp. 27-40). Lisboa: Chaves Ferreira - Publicações.
- American Heartworm Society [AHS] (2014). *Current canine guidelines for the prevention, diagnosis and management of heartworm (Dirofilaria immitis) infection in dogs*. Acedido em Ag. 12, 2014, disponível em: <https://www.heartwormsociety.org/veterinaryresources/american-heartworm-society-guidelines>.
- Annen, K., Friedman, K., Eshoa, C., Horowitz, M., Gottschall, J. & Straus, T. (2012): Two Cases of Transfusion-Transmitted *Anaplasma Phagocytophilum*. *Am J Clin Pathol*, 137, 562-565.
- Armés, S.M.M.C. (2010). *Rastreio de Leishmania infantum em cães assintomáticos na região de Mafra*. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade de Lisboa.
- Athanasίου, L.V., Kontos, V.I., Saridomichelakis, M.N., Rallis, T.S. & Diakou, A. (2012): A cross-sectional sero-epidemiological study of canine leishmaniasis in Greek mainland. *Acta Tropica*, 122, 291-295.
- Atkins, C. (2005). Canine Heartworm Disease. In Ettinger, S.J. & Feldman, E.C. (2005). *Textbook of Veterinary Internal Medicine. Diseases of the dog and cat – Vol. 2* (6th ed.). (pp.1118-1136). St. Louis, USA: Elsevier, Saunders.
- Baneth, G. (2010): *Ehrlichia and Anaplasma infections*. 35th World Small Animal Veterinary Congress-Geneva, Switzerland. Acedido em Mai. 5, 2015, disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2010/d12.pdf>.
- Baneth, G. (2011): Perspectives on canine and feline hepatozoonosis. *Veterinary Parasitology*, 181, 3-11.
- Baneth, G. (2012). Hepatozoonosis. *Hepatozoon canis* infection. In C. E. Greene, *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. (4th ed.). (pp. 750-757). Missouri, USA: Elsevier Saunders.
- Baneth, G & Aroch, I. (2008): Canine leishmaniasis: A diagnostic and clinical challenge. *The Veterinary Journal*, 175, 14-15.

- Baneth, G., Barta, J.R., Shkap, V., Martin, D.S., Macintire, D.K. & Vincent-Johnson, N. (2000): Genetic and antigenic evidence supports the separation of *Hepatozoon canis* and *Hepatozoon americanum* at the species level. *Journal of Clinical Microbiology*, Mar, 1298-1303.
- Baneth, G., Bourdeau, P., Bourdoiseau, G., Bowman, D., Breitschwerdt, E., Capelli, G., Cardoso, L., Dantas-Torres, F., Day, M., Dedet, J.P., Dobler, G., Ferrer, L., Irwin, P., Kempf, V., Kohn, B., Lappin, M., Little, S., Maggi, R., Miró, G., Naucke, T., Oliva, G., Otranto, D., Penzhorn, B., Pfeffer, M., Roura, X., Sainz, A., Shaw, S., Shin, S., Solano-Gallego, L., Straubinger, R., Traub, R., Trees, A., Truyen, U., Demonceau, T., Fitzgerald, R., Gatti, D., Hostetler, J., Kilmer, B., Krieger, K., Mencke, N., Mendão, C., Mottier, L., Pachnicke, S., Rees, B., Siebert, S., Stanneck, D., Mingote, M.T., von Simson, C., Weston, S. (2012): Vector-borne diseases-constant challenge for practicing veterinarians: recommendations from the CVBD World Forum. *Parasites & Vectors*, 5:55.
- Baneth, G., Harrus, S., Ohnana, S. & Schlesinger, Y. (2009): Longitudinal quantification of *Ehrlichia canis* in experimental infection with comparison to natural infection. *Veterinary Microbiology*, 136, 321-325.
- Baneth, G., Koutinas, A.F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P. & Ferrer, L. (2008): Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology*, Vol.24, n°7.
- Baneth, G., Mathew, J.S., Shkap, V., Macintire, D.K., Barta, J.R. & Ewing, S.A. (2003): Canine hepatozoonosis: two disease syndromes caused by separate *Hepatozoon* spp. *Trends in Parasitology*, Vol.19, N°1, Jan.
- Baneth, G., Shkap, V., Samish, M., Pipano, E. & Savitsky, I. (1998): Antibody response to *Hepatozoon canis* in experimentally infected dogs. *Veterinary Parasitology*, 74, 299-305.
- Baneth, G. & Solano-Gallego, L. (2012). Leishmaniasis. Global aspects of Leishmaniosis. In C. E. Greene, *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. (4th ed.). (pp. 734-746). Missouri, USA: Elsevier Saunders.
- Baneth, G. & Weigler (1997): Retrospective Case-Control Study of Hepatozoonosis in Dogs in Israel. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, Vol. 1, n° 6 (Nov-Dez), 365-370.
- Baptista-Fernandes, T., Marques, C., Rodrigues, O.R. & Santos-Gomes, G.M. (2007): Intra-specific variability of virulence in *Leishmania infantum* zymodeme MON-1 strains. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 30, 41-53.
- Barker, E.N., Tasker, S., Day, M.J., Warman, S.M., Woolley, K., Birtles, R., Georges, K.C., Ezeokoli, C.D., Newaj-Fyzul, A., Campbell, M.D., Sparagano, O.A.E., Cleaveland, S. & Helps, C.R (2010): Development and use of real-time PCR to detect and quantify *Mycoplasma haemocanis* and “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*” in dogs. *Veterinary Microbiology* 140, 167-170.
- Beaufils, J.P. (2012): Anémie hémolytique chez un chien infecté par *Mycoplasma haemocanis*. *Pratique médicale et chirurgicale de l'animal de compagnie*, 47, 43-47.
- Beugnet, F., Halos, L., Larsen, D., Labuschagné, M., Erasmus, H. & Fourie, J. (2014): The ability of an oral formulation of afoxolaner to block the transmission of *Babesia canis* by *Dermacentor reticulatus* ticks to dogs. *Parasites & Vectors*, 7:283.
- Bianciardi, P., Brovida, C., Valente, M., Aresu, L., Cavicchiolo, L., Vischer, C., Giroud, L. & Castagnaro, M. (2009): Administration of Miltefosine and Meglumine Antimoniate in Healthy Dogs: Clinicopathological Evaluation of the Impact on the Kidneys. *Toxicologic Pathology*, 37, 770-775.

Bourdeau, P., Saridomichelakis, M.N., Oliveira, A., Oliva, G., Kotnik, T., Gálvez, R., Manzano, V.F., Koutinas, A.F., Fonseca, I.P. & Miró, G. (2014): Management of canine leishmaniosis in endemic SW European regions: a questionnaire-based multinational survey. *Parasites & Vectors*, 7:110.

Bourguinat, C., Lee, A.C.Y., Lizundia, R., Blagburn, B.L., Liotta, J.L., Kraus, M.S., Keller, K., Epe, C., Letourneau, L., Kleinman, C.L., Paterson, T., Gomez, E.C., Montoya-Alonso, J.A., Smith, H., Bhan, A., Peregrine, A.S., Carmichael, J., Drake, J., Schenker, R., Kaminsky, R., Bowman, D.D., Geary, T.G. & Prichard, R.K. (2015): Macrocyclic lactone resistance in *Dirofilaria immitis*: Failure of heartworm preventives and investigation of genetic markers for resistance. *Veterinary Parasitology*, 210, 167-178.

Bowman, D.D. & Atkins, C.E. (2009): Heartworm biology, treatment and control. *Vet Clin Small Anim*, 39, 1127-1158.

Bowman, D.D. & Mannella, C. (2011): Macrocyclic Lactones and *Dirofilaria immitis* Microfilariae. *Topics in Companion Animal Medicine*, Vol. 26, nº 4, November.

Braga, M.S.C.O., André, M.R., Freschi, C.R., Teixeira, M.C.A. & Machado, R.Z. (2012): Molecular and serological detection of *Ehrlichia* spp. in cats on São Luis Island, Maranhão, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, Jaboticabal, Vol. 21, nº 1, jan-mar, 37-41.

Breitschwerdt, E.B. (2005). Obligate intracellular bacterial pathogens. In Ettinger, S.J. & Feldman, E.C. (2005). *Textbook of Veterinary Internal Medicine. Diseases of the dog and cat* – Vol. 1 (6th ed.). (pp.631-635). St. Louis, USA: Elsevier, Saunders.

Breitschwerdt, E.B., Davidson, M.G., Hegarty, B.C., Papich, M.G. & Grindem, C.B. (1997): Prednisolone at anti-inflammatory or immunosuppressive dosages in conjunction with doxycycline does not potentiate the severity of *Rickettsia rickettsii* infection in dogs. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 41, 141-147.

Brianti, E., Gaglio, G., Napoli, E., Giannetto, S., Dantas-Torres, F., Bain, O. & Otranto, D. (2012): New insights into the ecology and biology of *Acanthocheilonema reconditum* (Grassi, 1889) causing canine subcutaneous filarioses. *Parasitology*, April, 1-7.

Brouqui, P., Parola, P., Fournier, P.E. & Raoult, D. (2007): Spotted fever rickettsioses in southern and eastern Europe. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 49, 2-12.

Cacciò, S.M., Antunovic, B., Moretti, A., Mangili, V., Marinculic, A., Baric, R.R., Slemenda, S.B. & Pieniazek, N.J. (2002): Molecular characterisation of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* from naturally infected European dogs. *Veterinary Parasitology*, 106, 285-292.

Caeiros, A.P.S. (2012). *Detecção de Babesia spp. e de outros hemoparasitas em cães, por técnicas morfológicas, serológicas e moleculares, no distrito de Lisboa, Portugal*. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade de Lisboa.

Calvert, C.A. & Ridge, L.G. (2006). Heartworm disease. In *Saunders Manual of Small Animal Practice* (3rd ed.). (pp.1561-1573). Missouri: ELSEVIER.

Camacho, A.T., Pallas, E., Gestal, J.J., Guitián, F.J., Olmeda, A.S., Telford III, S.R. & Spielman, A. (2003): *Ixodes hexagonus* is the main candidate as vector of *Theileria annae* in northwest Spain. *Veterinary Parasitology*, 112, 157-63.

Campino, L., Pratlong, F., Abranches, P., Rioux, J.A., Santos-Gomes, G., Alves-Pires, C., Cortes, S., Ramada, J., Cristovão, J.M., Afonso, M.O. & Dedet, J.P. (2006): Leishmaniasis in Portugal: enzyme

- polymorphism of *Leishmania infantum* based on the identification of 213 strains. *Tropical Medicine and International Health*. Vol. II, nºII, 1708-1714.
- Caprariis, D., Dantas-Torres, F., Capelli, G., Mencke, N., Stanneck, D., Breitschwerdt, E.B. & Otranto, D. (2011): Evolution of clinical, haematological and biochemical findings in young dogs naturally infected by vector-borne pathogens. *Veterinary Microbiology*, 149, 206-212.
- Cárdenas, A.M., Doyle, C.K., Zhang, X., Nethery, K., Corsvet, R.E., Walker, D.H. & McBride, J.W. (2007): Enzyme-linked immunosorbent assay with conserved immunoreactive glycoproteins gp36 and gp19 has enhanced sensitivity and provides species-specific immunodiagnosis of *Ehrlichia canis* infection. *Clinical and vaccine immunology*, Feb., 123-128.
- Cardoso, L. (2015): Fipronil and permethrin combination: a novel ectoparasiticide for dogs. *Parasites & Vectors*, 8:53. *Parassitologia*, 48, 131-133.
- Cardoso, L., Cortes, H.C.E., Eyal, O., Reis, A., Lopes, A.P., Vila-Viçosa, M.J., Rodrigues, P.A. & Baneth, G. (2014): Molecular and histopathological detection of *Hepatozoon canis* in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Portugal. *Parasites & Vectors*, 7:113.
- Cardoso, L., Costa, A., Tuna, J., Vieira, L., Eyal, O., Yisaschar-Mekuzas, Y.Y. & Baneth, G. (2008): *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* infections in dogs from northern Portugal. *Veterinary Parasitology*, 156, 199-204.
- Cardoso, L., Gilad, M., Cortes, H.C.E., Nachum-Biala, Y., Lopes, A.P., Vila-Viçosa, M.J., Simões, M., Rodrigues, P.A. & Baneth, G. (2015): First report of *Anaplasma platys* infection in red foxes (*Vulpes vulpes*) and molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Leishmania infantum* in foxes from Portugal. *Parasites & Vectors*, 8:144.
- Cardoso, L., Mendão, C. & Madeira de Carvalho, L. (2012): Prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* spp. and *Leishmania infantum* in apparently healthy and CVBD-suspect dogs in Portugal: a national serological study. *Parasites & Vectors*, 5:62.
- Cardoso, L., Tuna, J., Vieira, L., Yisaschar-Mekuzas, Y. & Baneth, G. (2010): Molecular detection of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from the North of Portugal. *The Veterinary Journal*, 183, 232-233.
- Cardoso, L., Yisaschar-Mekuzas, Y., Rodrigues, F.T., Costa, A., Machado, J., Diz-Lopes, D. & Baneth, G. (2010): Canine babesiosis in northern Portugal and molecular characterization of vector-borne co-infections. *Parasites & Vectors*, 3:27.
- Carrade, D.D., Foley, J.E., Borjesson, D.L. & Sykes, J.E. (2009): Canine granulocytic anaplasmosis: a review. *J Vet Intern Med*, 23, 1129-1141.
- Cascio, A. & Iaria, C. (2006): Epidemiology and clinical features of Mediterranean Spotted Fever in Italy.
- Ceccarelli, M., Galluzzi, L., Sisti, D., Bianchi, B. & Magnani, M. (2014): Application of qPCR in conjunctival swab samples for the evaluation of canine leishmaniasis in borderline cases or disease relapse and correlation with clinical parameters. *Parasites & Vectors*, 7:460.
- Chalker, V.J. (2005): Canine mycoplasmas. *Research in Veterinary Science*, 79, 1-8.
- Chomel, B. (2011): Tick-borne infections in dogs—An emerging infectious threat. *Veterinary Parasitology*, 179, 294-301.

Clube do Podengo Português (2015). Acedido em Nov. 17, 2015, disponível em <http://clubedopodengoportugues.com/podengo.html>.

Comptom, S.M., Maggi, R.G. & Breitschwerdt, E.B. (2012): *Candidatus* Mycoplasma haematoparvum and *Mycoplasma haemocanis* infections in dogs from the United States. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 35, 557– 562.

Cornell University College of Veterinary Medicine: Occult Heartworm test interpretations. Acedido em Jul. 24, 2015, disponível em: https://ahdc.vet.cornell.edu/test/list.aspx?Species=5&Test_Name=dirofilaria&TstTyp=&WebDisc=9.

Cortes, S., Afonso, M.O., Alves-Pires, C. & Campino, L. (2007): Stray Dogs and Leishmaniasis in Urban Areas, Portugal. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 13, nº 9, September.

Cortes, S., Vaz, Y., Neves, R., Maia, C., Cardoso, L. & Campino, L. (2012): Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean region. *Veterinary Parasitology*, 189, 189– 196.

Coutinho, M.T.Z. & Linardi, P.M. (2007): Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? *Veterinary Parasitology*, 147, 320–325.

Crawford, K., Walton, J., Lewis, S., Tasker & Warman, S.M. (2013): Infectious agent screening in canine blood donors in the United Kingdom. *Journal of Small Animal Practice*, 54, 414–417.

Criado-Fornelio, A., Buling, A., Cunha-Filho, N.A., Ruas, J.L., Farias, N.A.R., Rey-Valeiron, C., Pingret, J.L., Etievant, M. & Barba-Carretero, J.C. (2007): Development and evaluation of a quantitative PCR assay for detection of *Hepatozoon* sp. *Veterinary Parasitology*, 150, 352–356.

Dantas-Torres, F. (2008): Canine vector-borne diseases in Brazil. *Parasites & Vectors*, 1:25.

Dantas-Torres, F. (2008): The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. *Veterinary Parasitology*, 152, 173–185.

Dantas-Torres, F. (2010): Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites & Vectors*, 3:26.

Dantas-Torres, F. (2011): Ticks as vectors of *Leishmania* parasites. *Trends in Parasitology*, April, Vol. 27, nº 4.

Dantas-Torres, F., Capelli, G., Gianelli, A., Ramos, R.A.N., Lia, R.P., Cantacessi, C., Caprariis, D., Tommasi, A. S., Latrofa, M.S., Lacasella, V., Tarallo, V.D., Paola, G., Quorollo, B., Breitschwerdt, E., Stanneck, D. & Otranto, D. (2013): Efficacy of an imidacloprid/ flumethrin collar against fleas, ticks and tick-borne pathogens in dogs. *Parasites & Vectors*, 6:245.

Dantas-Torres, F., Chomel, B.B. & Otranto, D. (2012a): Ticks and tick-borne diseases: A one health perspective. *Trends in Parasitology*, October, Vol. 28, Nº 10, 437–446.

Dantas-Torres, F., Figueredo, L.A. (2006). Canine babesiosis: A Brazilian perspective. *Veterinary Parasitology*, 141, 197–203.

Dantas-Torres, F., Solano-Gallego, L., Baneth, G., Ribeiro, V.M., Paiva-Cavalcanti, M. & Otranto, D. (2012b): Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. *Trends in Parasitology*, December, Vol. 28, nº 12.

- Day, M; Shaw, S. (2005). Arthropod-borne Infectious Diseases of the Dog and Cat. Manson Publishing Ltd, London. (pp. 9 – 10).
- Day, M.J. (2011). The immunopathology of canine vector-borne diseases. *Parasites & Vectors*, 4:48.
- De Freitas, C.C.J. & Pinheiro, D.C.S.N. (2010): Aspectos celulares e moleculares da resposta imunitária a *Leishmania spp.* Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias, 105, (573-576), 11-20.
- Dhand, A., Nadelman, R.B., Agüero-Rosenfeld, M., Haddad, F.A., Stokes, D. & Horowitz, H.W. (2007): Human Granulocytic Anaplasmosis during pregnancy: case series and literature review. *Clinical Infectious Diseases*, 45, 589-93.
- Díaz, S., Fonseca, I.P., Rodrigues, A., Martins, C., Cartaxeiro, C., Silva, M.J., De Brito, T.V., Alexandre Pires, G. & Santos-Gomes, G.M. (2012): Canine leishmaniosis. Modulation of macrophage/lymphocyte interactions by *L. infantum*. *Veterinary Parasitology*, 189, 137-144.
- Díaz-Sáez, V., Merino-Espinosa, G., Morales-Yuste, M., Corpas-López, V., Pratlong, F., Morillas-Márquez, F. & Martín-Sánchez, J. (2014): High rates of *Leishmania infantum* and *Trypanosoma nabiasi* infection in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in sympatric and syntrophic conditions in an endemic canine leishmaniasis area: Epidemiological consequences. *Veterinary Parasitology*, 202, 119-127.
- Diniz, P.P. & Breitschwerdt, E. (2012). *Ehrlichia* and *Anaplasma* infections. *Anaplasma phagocytophilum* infection. In C. E. Greene, *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. (4th ed.). (pp. 244-254). Missouri, USA: Elsevier Saunders.
- Duarte, S.C., Louly, C.C.B., Neto, O.J.S., Romanowski, T.N.A., Junior, R.S. L. & Linhares, G.F.C. (2008): Diagnóstico parasitológico e molecular da Babesiose canina na cidade de Goiânia-GO. *Revista de patologia tropical*, julho-setembro, Vol. 37 (3), 229-236.
- Dujardin, C., Campino, L., Cañavate, C., Dedet, J.P., Gradoni, L., Soteriadou, K., Mazeris, A., Ozbek, Y. & Boelaert, M. (2008): Spread of Vector-borne Diseases and Neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 14, nº. 7, July.
- Dumont, P., Blair, J., Fourie, J.J., Chester, T.S., Larsen, D.L. (2014): Evaluation of the efficacy of afoxolaner against two European dog tick species: *Dermacentor reticulatus* and *Ixodes ricinus*. *Veterinary Parasitology*, 201, 216-219.
- Duque, V., Ventura, C., Seixas, D., Barai, A., Mendonça, N., Martins, J., Cunha, S. & Melo-Silvestre, A. (2011): Mediterranean spotted fever and encephalitis: a case report and review of the literature. *Journal of Infection Chemotherapy*, 18, 105-108.
- Ebani, V.V., Bertelloni, F., Torracca, B. & Cerri, D. (2014): Serological survey of *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Ehrlichia canis* infections in rural and urban dogs in Central Italy. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, Vol 21, No 4, 671-675.
- Ebani, V.V., Nardoni, S., Fognani, G., Mugnaini, L., Bertelloni, F., Rocchigiani, G., Papini, R.A., Stefani, F. & Mancianti, F. (2015): Molecular detection of vector-borne bacteria and protozoa in healthy hunting dogs from Central Italy. *Asian Pac J Trop Biomed*, 5(2), 108-112.
- European Scientific Counsel Companion Animal Parasites (ESCCAP) (2012): Control of vector-borne diseases in dogs and cats. Guideline 05 Second Edition- October. Acedido em Jan. 25, 2014, disponível em: <http://www.esccap.org/uploads/file/ESCCAP%20Guidelines%20GL5%2001Oct2012.pdf>.

European Scientific Counsel Companion Animal Parasites (ESCCAP) (2015): Control of ectoparasites in dogs and cats. Guideline 03 Third Edition - September. Acedido em Nov. 17, 2012, disponível em http://www.esccap.org/uploads/docs/ise18g5s_ESCCAP_Guideline_03_Third_Edition__September_2015.pdf.

Fankhauser, B., Dumont, P., Hunter III, J.S., McCall, J.W., Kaufmann, C., Mathis, A., Young, D.R., Carroll, S.P., McCall, S., Chester, S.T. & Soll, M.D. (2015): Repellent and insecticidal efficacy of a new combination of fipronil and permethrin against three mosquito species (*Aedes albopictus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*) on dogs. *Parasites & Vectors*, 8:64.

Faria, J.L.M., Dagnone, A.S., Munhoz, T.D., João, C.F., Pereira, W.A.B., Machado, R.Z. & Tinucci-Costa, M. (2010): *Ehrlichia canis* morulae and DNA detection in whole blood and spleen aspiration samples. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, Jaboticabal, Vol. 19, nº 2, 98-102, abr-jun.

Farkas, R. (2013). Clinical monographs – Protozoonosis. Canine babesiosis. In F. Beugnet, *Guide to vector borne diseases of pets* (pp. 267-279).

Félix, L.I.B. (2015). *Parasitoses gastrointestinais e cardiopulmonares em cães. Estudo epidemiológico em canis de Portugal Continental*. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade de Lisboa.

Ferasin, L. & Knight, D. (2005). Filarial infections. In Shaw, S. & Day, M. (2005). *Arthropod-borne infectious diseases of the dog and cat*. (pp. 51 - 61). London: Manson Publishing.

Ferreira, M.F. (2008). *Parasitoses caninas transmitidas por ixodídeos*. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade de Lisboa.

Ferreira, M.G.P.A., Fattori, K.R., Souza, F. & Lima, V.M.F. (2009): Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. *Veterinary Parasitology*, 165, 150–154.

Ferreira, E.C., Lana, M., Carneiro, M., Reis, A.B., Paes, D.V., Silva, E.S., Schallig, H. & Gontijo, C.M.F. (2007): Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Veterinary Parasitology* 146, 235-241.

Ferreira, C.A.C., Mixão, V.P., Novo, M.T.L.M., Calado, M.M.P., Gonçalves, L.A.P., Belo, S.M.D. & De Almeida, A.P.G. (2015): First molecular identification of mosquito vectors of *Dirofilaria immitis* in continental Portugal. *Parasites & Vectors*, 8:139.

Figueiredo, T.C.D. (2008). *Estudo da Prevalência de Doenças Associadas a Vetores em Canídeos Domésticos do Distrito de Bragança*. Tese de Mestrado em Microbiologia química. Lisboa: Faculdade de Medicina de Lisboa. Universidade de Lisboa.

Fonseca, M.J.D. (2009). *Estudo da seroprevalência de Anticorpos Anti-Leishmania spp. numa população que coabita com canídeos com leishmaniose*. IV Edição do Mestrado em Doenças Infecciosas Emergentes. Lisboa: Faculdade de Medicina de Lisboa. Universidade de Lisboa.

Forlano, M., Scofield, A., Elisei, C., Fernandes, K.R., Ewing, S.A. & Massard, C.L. (2005): Diagnosis of *Hepatozoon* spp. in *Amblyomma ovale* and its experimental transmission in domestic dogs in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 134, 1-7.

Forlano, M.D., Teixeira, K.R.S., Scofield, A., Elisei, C., Yotoko, K.S.C., Fernandes, K.R., Linhares, G.F.C., Ewing, S.A. & Massard, C.L. (2007): Molecular characterization of *Hepatozoon* sp. from Brazilian dogs and its phylogenetic relationship with other *Hepatozoon* spp.. *Veterinary Parasitology*, 145, 21-30.

- Furuta, P.I., Oliveira, T.M.F.S., Teixeira, M.C.A., Rocha, A.G., Machado, R.Z. & Tinucci-Costa, M. (2009): Comparison between a soluble antigen-based ELISA and IFAT in detecting antibodies against *Babesia canis* in dogs. *Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal*, Vol. 18, nº 3, 41-45, jul.-set.
- Garrido, J.M.C.B.G. (2012). *Contribuição para o estudo da prevalência da infeção por Leishmania infantum em gatos domésticos e errantes nos distritos de Lisboa e Viseu*. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade de Lisboa.
- Gaskin, A.A., Schantz, P., Jackson, J., Birkenheuer, A., Tomlinson, L., Gramiccia, M., Levy, M., Steurer, F., Kollmar, E., Hegarty, B.C., Ahn, A. & Breitschwerdt, E.B. (2002): Visceral Leishmaniasis in a New York Foxhound Kennel. *J Vet Intern Med*, 16, 34-44.
- Genchi, C., Genchi, M., Gabriele, P., Kruedewagen, E.M. & Schaper, R. (2013): Evaluation of the efficacy of Imidacloprid 10 % / Moxidectin 2.5 % (Advocate®, Advantage® Multi, Bayer) for the prevention of *Dirofilaria repens* infection in dogs. *Parasitol Res*, 112:S81–S89.
- Genchi, C., Rinaldi, L., Mortarino, M., Genchi, M. & Cringoli, G. (2009): Climate and *Dirofilaria* infection in Europe. *Veterinary Parasitology*, 163, (2009) 286-292.
- Gomes, P.I.S. (2015). *Deteção de infeção por Leishmania spp., em gatos da área metropolitana de Lisboa, através de técnicas de diagnóstico serológico (IFI e ELISA) e de uma técnica molecular (qPCR) aplicada a células conjuntivais e a sangue*. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade de Lisboa.
- Gomes, Y.M., Cavalcanti, M.P., Lira, R.A., Abath, F.G.c & Alves, L.C. (2008): Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. *The Veterinary Journal*, 175, 45-52.
- Gómez-Ochoa, P., Castillo, J.A., Gascón, M., Zarate, J.J., Alvarez, F. & Couto, C.G. (2009): Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: A clinical trial. *The Veterinary Journal*, 179, 259–263.
- Gonen, L., Strauss-Ayali, D., Shkap, V., Vincent-Johnson, N., Macintire, D.K. & Baneth, G. (2004): An enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Hepatozoon canis*. *Veterinary Parasitology*, 122, 131-139.
- Gradoni, L. (2015): Canine Leishmania vaccines: Still a long way to go. *Veterinary Parasitology* 208, 94-100.
- Gramiccia, M. (2011): Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Veterinary Parasitology*, 181, 23-30.
- Gramiccia, M. & Gradoni, L. (2005): The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology* 35, 1169–1180.
- Gray, J., Dantas-Torres, F., Estrada-Peña, A. & Levin, M. (2013): Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Ticks and Tick-borne Diseases* 4, 171-180.
- Greene, C.E., Kidd, L. & Breitschwerdt, E.B. (2012). Rocky Mountain and Mediterranean Spotted Fevers, Cat-Flea Typhuslike Illness, Rickettsialpox, and Typhus. Rocky Mountain Spotted fever. Mediterranean Spotted Fever. In C. E. Greene, *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. (4th ed.). (pp. 259-268). Missouri, USA: Elsevier Saunders.
- Halos, L., Lebon, W., Chalvet-Monfray, K., Larsen, D. & Beugnet, F. (2014): Immediate efficacy and persistent speed of kill of a novel oral formulation of afoxolaner (NexGard™) against induced infestations with *Ixodes ricinus* ticks. *Parasites & Vectors*, 7:452.

- Harrus, S., Kass, P.H., Klement, E. & Waner, T. (1997): Canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. *Veterinary Record*, 141, 360-363.
- Harrus, S., Lior, Y., Ephros, M., Grisaru-Soen, G., Keysary, A., Strenger, C., Jongejan, F., Waner, T. & Baneth, G. (2007): *Rickettsia conorii* in Humans and Dogs: A Seroepidemiologic Survey of Two Rural Villages in Israel. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 77(1), pp. 133–135.
- Harrus, S., Waner, T., Aizenberg, I. & Bark, H. (1998): Therapeutic effect of doxycycline in experimental subclinical canine monocytic ehrlichiosis: evaluation of a 6-Week Course. *Journal of Clinical Microbiology*, July, 2140-2142.
- Harrus, S., Waner, T., Aizenberg, I., Foley, J.E., Poland, A.M. & Bark, H. (1998): Amplification of Ehrlichial DNA from Dogs 34 Months after infection with *Ehrlichia canis*. *Journal of Clinical Microbiology*, Jan., 73-76.
- Harrus, S. & Waner, T. (2011): Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. *The Veterinary Journal*, 187, 292–296.
- Harrus, S. & Waner, T. (2013). Clinical monographs – Bacterial diseases. Canine monocytic ehrlichiosis. In F. Beugnet, *Guide to vector borne diseases of pets* (pp. 157-165).
- Harrus, S., Waner, T. & Neer, T.M. (2012). *Ehrlichia* and *Anaplasma* infections. *Ehrlichia canis* infection. In C. E. Greene, *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. (4th ed.). (pp. 227-237). Missouri, USA: Elsevier Saunders.
- Harvey, J.W. (2012). *Ehrlichia* and *Anaplasma* infections. *Anaplasma platys* infection. In C. E. Greene, *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. (4th ed.). (pp. 256-259). Missouri, USA: Elsevier Saunders.
- Helhazar, M., Leitão, J., Duarte, A., Tavares, L. & Da Fonseca, I.P. (2013): Natural infection of synanthropic rodent species *Mus musculus* and *Rattus norvegicus* by *Leishmania infantum* in Sesimbra and Sintra – Portugal. *Parasites & Vectors*, 6:88.
- Horak, I.G., Fourie, J.J. & Stanneck, D. (2012): Efficacy of slow-release collar formulations of imidacloprid/flumethrin and deltamethrin and of spot-on formulations of fipronil/(s) - methoprene, dinotefuran/pyriproxyfen/permethrin and (s) –methoprene/amitraz/fipronil against *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis felis* on dogs. *Parasites & Vectors*, 5:79.
- Hulme-Moir, K.L., Barker, E.N., Stonelake, A., Helps, C.R. & Tasker, S. (2010): Use of real-time quantitative polymerase chain reaction to monitor antibiotic therapy in a dog with naturally acquired *Mycoplasma haemocanis* infection. *J Vet Diagn Invest*, 22, :582–587.
- Huynh, T., Thean, J. & Maini, R. (2001): *Dipetalonema reconditum* in the human Eye. *Br J Ophthalmol*, 85, 1384-1393.
- Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA): Normas climatológicas. Acedido em Out. 15, 2015, disponível em: <http://www.ipma.pt/pt/oclima/normais.clima/>.
- Irwin, P.J. (2009): Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. *Parasites & Vectors*, 2, S1:S4.

- Jüttner, C., Sánchez, M.R., Landaras, E.R., Slappendel, R.J. & Arnold, C.F. (2001): Evaluation of the potential causes of epistaxis in dogs with natural visceral leishmaniasis. *Veterinary Record*, 149, 176-179.
- Karagenc, T.I., Pasa, S., Kirli, G., Hosgor, M., Bilgic, H.B., Ozon, Y.H., Atasoy, A. & Eren, H. (2006): A parasitological, molecular and serological survey of *Hepatozoon canis* infection in dogs around the Aegean coast of Turkey. *Veterinary Parasitology*, 135, 113-119.
- Kemming, G.I., Messick, J.B., Enders, G., Boros, M., Lorenz, B., Muenzing, S., Kisch-Wedel, H., Mueller, W., Hahmann-Mueller, A., Messmer, K. & Thein, E. (2004): *Mycoplasma haemocanis* Infection - A Kennel Disease? *Comparative Medicine*, Vol. 54, N°4, 404 – 409.
- Kenny, M.J., Shaw, S.E., Beugnet, F. & Tasker, S. (2004): Demonstration of Two Distinct Hemotropic Mycoplasmas in French Dogs. *Journal of clinical microbiology*, Vol.42, N°11, 5397–5399.
- Kidd, L., Maggi, R., Diniz, P.P.V.P., Hegarty, B., Tucker, M. & Breitschwerdt, E. (2008): Evaluation of conventional and real-time PCR assays for detection and differentiation of Spotted Fever Group Rickettsia in dog blood. *Veterinary Microbiology*, 129, 294-303.
- Kjemtrup, A.M., Wainwright, K., Miller, M., Penzhorn, B.L. & Carreno, R.A. (2006): *Babesia conradae*, sp. Nov., a small canine Babesia identified in California. *Veterinary Parasitology*, 138, 103–111.
- Kohn, B., Galke, D., Beelitz, P. & Pfister, K. (2008): Clinical features of canine granulocytic anaplasmosis in 18 naturally infected dogs. *J Vet Intern Med*, 22, 1289-1295.
- Kraje, A.C. (2001): Canine Haemobartonellosis and Babesiosis. *Compendium. Small animal/ Exotics*, Vol. 23, No. 4.
- Kramer, L. & Genchi, C. (2014): Where are we with Wolbachia and doxycycline: An in-depth review of the current state of our knowledge. *Veterinary Parasitology*, 206, 1-4.
- Kunkle, B., Daly, S., Dumont, P., Drag, M. & Larsen, D. (2014): Assessment of the efficacy of orally administered afoxolaner against *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*. *Veterinary Parasitology*, 201, 226-228.
- Lappin, M.R. (2005). Protozoal and miscellaneous infections. In Ettinger, S.J. & Feldman, E.C. (2005). *Textbook of Veterinary Internal Medicine. Diseases of the dog and cat – Vol. 1* (6th ed.). (pp.638-644). St. Louis, USA: Elsevier, Saunders.
- Leontides, L.S., Saridomichelakis, M.N., Billinis, C., Kontos, V., Koutinas, A.F., Galatos, A.D. & Mylonakis, M.E. (2002): A cross-sectional study of *Leishmania* spp. Infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. *Veterinary Parasitology* 109, 19–27.
- Lester, S.J., Hume, J.B. & Phipps, B. (1995): *Haemobartonella canis* infection following splenectomy and transfusion. *Can Vet J*, Vol. 36, 444-445.
- Levin, M.L., Killmaster, L.F. & Zemtsova, G.E. (2012): Domestic Dogs (*Canis familiaris*) as Reservoir hosts for *Rickettsia conorii*. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, Jan. 2012, Vol. 12, N° 1, 28-33.
- Levin, M.L., Zemtsova, G.E., Montgomery, M. & Killmaster, L.F. (2014): Effects of homologous and heterologous immunization on the reservoir competence of domestic dogs for *Rickettsia conorii (israelensis)*. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 5, 33– 40.

- Letendre, L., Huang, R., Kvaternick, L., Harriman, J., Drag, M. & Soll, M. (2014): The intravenous and oral pharmacokinetics of afoxolaner used as a monthly chewable antiparasitic for dogs. *Veterinary Parasitology*, 201, 190–197.
- Li, Y., Wang, C., Allen, K.E., Little, S.E., Ahluwalia, S.K., Gao, D., Macintire, D.K., Blagburn, B.L. & Kaltenboeck, B. (2008): Diagnosis of canine *Hepatozoon* spp. infection by quantitative PCR. *Veterinary Parasitology*, 157, 50-58.
- Little, S. , Raymond, M.R., Thomas, J.E. , Gruntmeir, J., Hostetler, J.A. , Meinkoth, J.H. & Blagburn, B.L. (2014): Heat treatment prior to testing allows detection of antigen of *Dirofilaria immitis* in feline serum. *Parasites & Vectors*, 7:1.
- Llera, J.L.G., García, M.L.L., Reinoso, E.M. & González, R.V. (2002): Differential serological testing by simultaneous indirect immunofluorescent antibody test in canine leishmaniosis and ehrlichiosis. *Veterinary Parasitology*, 109, 185-190.
- Lombardo, G., Pennisi, M.G., Lupo, T., Migliazzo, A., Caprí, A. & Solano-Gallego, L. (2012): Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. *Veterinary Parasitology*, 184, 10-17.
- Louro, E., Campos, A., Leitão, J., Carvalho, A., Santos, R., Reis, C., Almiro, E. & Porto, A. (2005): Febre escaro-nodular: uma zoonose benigna? *Revista da Sociedade Portuguesa de Medicina Interna*. Vol. 13, Nº1, 14-18.
- Maggi, R.G., Birkenheuer, A.J., Hegarty, B.C., Bradley, J.M., Levy, M.G. & Breitschwerdt, E.B. (2014): Comparison of serological and molecular panels for diagnosis of vector-borne diseases in dogs. *Parasites & Vectors*, 7:127.
- Magnis, J., Lorentz, S., Guardone, L., Grimm, F., Magi, M., Naucke, T.J. & Deplazes, P. (2013): Morphometric analyses of canine blood microfilariae isolated by the Knott's test enables *Dirofilaria immitis* and *D. repens* species-specific and *Acanthocheilonema* (syn. *Dipetalonema*) genus-specific diagnosis. *Parasites & Vectors*, 6:48.
- Maia, C., Gomes, J., Cristóvão, J., Nunes, M., Martins, A., Rebêlo, E. & Campino, L. (2010): Feline *Leishmania* infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. *Veterinary Parasitology*, 174, 336-340.
- Maia, C., Almeida, B., Coimbra, M., Fernandes, M.C., Cristóvão, J.M., Ramos, C., Martins, A., Martinho, F., Silva, P., Neves, N., Nunes, M., Vieira, M.L., Cardoso, L. & Campino, L. (2015): Bacterial and protozoal agents of canine vector-borne diseases in the blood of domestic and stray dogs from southern Portugal. *Parasites & Vectors*, 8:138.
- Maia, C., Coimbra, M., Ramos, C., Cristóvão, J.M., Cardoso, L. & Campino, L. (2015): Serological investigation of *Leishmania infantum*, *Dirofilaria immitis* and *Angiostrongylus vasorum* in dogs from southern Portugal. *Parasites & Vectors*, 8:152.
- Maia, C., Ferreira, A., Nunes, M., Vieira, M.L., Campino, L. & Cardoso, L. (2014): Molecular detection of bacterial and parasitic pathogens in hard ticks from Portugal. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 5, 409-414.
- Maia, C., Ramos, C., Coimbra, M., Bastos, F., Martins, A., Pinto, P., Nunes, M., Vieira, M.L., Cardoso, L. & Campino, L. (2014): Bacterial and protozoal agents of feline vector-borne diseases in domestic and stray cats from southern Portugal. *Parasites & Vectors*, 7:115.

- Maia, C., Ramos, C., Coimbra, M., Cardoso, L. & Campino, L. (2015): Prevalence of *Dirofilaria immitis* antigen and antibodies to *Leishmania infantum* in cats from southern Portugal. *Parasitology International*, 64, 154-156.
- Maia, C., Lorentz, S., Cardoso, L., Otranto, D. & Naucke, T.J. (2016): Detection of *Dirofilaria repens* microfilariae in a dog from Portugal. *Parasitol Res*, 115, 441 - 443.
- Manzillo, V.F., Oliva, G., Pagano, A., Manna, L., Maroli, M. & Gradoni, L. (2006): Deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis: Evaluation of the protective effect and influence on the clinical outcome of *Leishmania* infection in kennelled stray dogs. *Veterinary Parasitology*, 142, 142-145.
- Marchetti, V., Lubas, G., Baneth, G., Modenato, M. & Mancianti, F. (2009): Hepatozoonosis in a dog with skeletal involvement and meningoencephalomyelitis. *Veterinary Clinical Pathology*, 38/1, 121-125.
- Matijatko, V., Mrljak, V., Kis, I., Kucer, N., Forsek, J., Zivicnjak, T., Romié, Z., Simec, Z. & Ceron, J.J. (2007): Evidence of an acute phase response in dogs naturally infected with *Babesia canis*. *Veterinary Parasitology*, 144, 242-250.
- Matijatko, V., Kis, I., Torti, M., Brkljacic, M., Rafaj, R.B., Zvorc, Z. & Mrljak, V. (2010): Systemic inflammatory response syndrome and multiple organ dysfunction syndrome in canine babesiosis. *Veterinarski Arhiv*, 80 (5), 611-626.
- McCall, J.W., Genchi, C., Kramer, L., Guerrero, J., Dzimirski, M.T., Supakorndej, P., Mansour, A.M., McCall, S.D., Supakorndej, N., Grandi, G. & Carson, B. (2008): Heartworm and *Wolbachia*: Therapeutic implications. *Veterinary Parasitology*, 158, 204-214.
- McClure, J., Crothers, M.L., Schaefer, J.J., Stanley, P.D., Needham, G.R., Ewing, S.A. & Stich, R. (2010): Efficacy of a doxycycline treatment regimen initiated during three different phases of experimental ehrlichiosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, Dec., 5012-5020.
- Meireles, J.A.F.S. (2008). Terapêutica e profilaxia da Leishmaniose canina. In Santos-Gomes, G., & Pereira da Fonseca, I. *Leishmaniose Canina*. (pp. 93-104). Lisboa: Chaves Ferreira - Publicações.
- Merial (2014). Bula Frontline. Acedido a Out, 27, 2015. Disponível em: <http://www.frontline.pt/sitecollectiondocuments/Frontline-Spray-Symposium.pdf>.
- Menn, B., Lorentz, S. & Naucke, T.J. (2010): Imported and travelling dogs as carriers of canine vector-borne pathogens in Germany. *Parasites & Vectors*, 3:34.
- Merhej, V., Angelakis, E., Socolovschi, C. & Raoult, D. (2014): Genotyping, evolution and epidemiological findings of *Rickettsia* species. *Infection, Genetics and Evolution*, 25, 122-137.
- Messick, J.B. & Harvey, J.W. (2012). Hemotropic Mycoplasmosis. In C. E. Greene, *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. (4th ed.). (pp. 310-319). Missouri, USA: Elsevier Saunders.
- Messick, J.B., Walker, P.G., Raphael, W., Berent, L. & Shi, Xun. (2002): ‘*Candidatus Mycoplasma haemodidelphidis*’ sp. nov., ‘*Candidatus Mycoplasma haemolamae*’ sp. nov. and *Mycoplasma haemocanis* comb. nov., haemotrophic parasites from a naturally infected opossum (*Didelphis virginiana*), alpaca (*Lama pacos*) and dog (*Canis familiaris*): phylogenetic and secondary structural relatedness of their 16S rRNA genes to other mycoplasmas. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 693-698.

- Mettler, M., Grimm, F., Capelli, G., Camp, Heinrich & Deplazes, P. (2005): Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays, an Immunofluorescent-Antibody Test, and Two Rapid Tests (Immunochromatographic-Dipstick and Gel Tests) for Serological Diagnosis of Symptomatic and Asymptomatic Leishmania Infections in Dogs. *Journal of Clinical Microbiology*, Nov., 5515-5519.
- Miró, G., Gálvez, R., Mateo, M., Montoya, A., Descalzo, M.A. & Molina, R. (2007): Evaluation of the efficacy of a topically administered combination of imidacloprid and permethrin against *Phlebotomus perniciosus* in dog. *Veterinary Parasitology*, 143, 375-379.
- Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Oliva, G. & Banteh, G. (2008): Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends in Parasitology*, Vol.24 n°8, 371-377.
- Miró, G., Montoya, A., Roura, X., Gálvez, R. & Sainz, A. (2013): Seropositivity rates for agents of canine vector-borne diseases in Spain: a multicentre study. *Parasites & Vectors*, 6:117.
- Molina, R., Jiménez, M.I., Cruz, I., Iriso, A., Martín-Martín, I., Sevillano, O., Melero, S. & Bernal, J. (2012): The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Veterinary Parasitology*, 190, 268-271.
- Montarsi, F., Ciocchetta, S., Devine, G., Ravagnan, S., Mutinelli, F., Frangipane di Regalbono, A., Otranto, D. & Capelli, G. (2015): Development of *Dirofilaria immitis* within the mosquito *Aedes (Finlaya) koreicus*, a new invasive species for Europe. *Parasites & Vectors*, 8:177.
- Mórchón, R., Carretón, E., González-Miguel, J. & Mellado-Hernández, I. (2012): Heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) and their vectors in Europe– new distribution trends. *Frontiers in Physiology; Systems Biology*, Jun, Vol. 3, article196.
- Moreno, J. & Alvar, J. (2002): Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology*, Vol.18, n° 9, September, 2002.
- Moshfe, A., Mohebal, M., Edrissian, G., Zarei, Z., Akhoundi, B., Kazemi, B., Jamshidi, S. & Mahmoodi, M. (2009): Canine visceral leishmaniasis: Asymptomatic infected dogs as a source of *L. infantum* infection. *Acta Tropica*, 112, 101-105.
- Mylonakis, M.E., Koutinas, A.F., Billinis, C., Leontides, L.S., Kontos, V., Papdopoulos, O., Rallis, T. & Fytianou, A. (2003): Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. *Veterinary Microbiology*, 91, 197–204.
- Mylonakis, M.E., Siarkou, V.I. & Koutinas, A.F. (2010): Myelosuppressive canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an update on the pathogenesis, diagnosis and management. *Israel journal of veterinary medicine*. Vol. 65 (4), 129-135.
- Navarro, C., Reymon, N., Fourie, J., Hellmann, K. & Bonneau, S. (2015): Prevention of Babesia canis in dogs: efficacy of a fixed combination of permethrin and fipronil (Effitix®) using an experimental transmission blocking model with infected Dermacentor reticulatus ticks. *Parasites & Vectors*, 8:32.
- Neer, T.M., Breitschwerdt, E.B., Greene, R.T. & Lappin, M. (2002): Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. *J Vet Intern Med*, 16, 309-315.
- Nicholson, W.L., Allen, K.E., McQuiston, J.H., Breitschwerdt, E.B. & Little, S.E. (2010): The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. *Trends in Parasitology*, Vol.26, n°4, 205-212.

Noli, C. & Saridomichelakis, M.N. (2014): An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). *The Veterinary Journal*, 202, 425-435.

Novacco, M., Meli, M.L., Gentilini, F., Marsilio, F., Ceci, C., Pennisi, M.G., Lombardo, G., Lloret, A., Santos, L., Carrapiço, T., Willi, B., Wolf, G., Lutz, H. & Hofmann-Lehmann, R. (2010): Prevalence and geographical distribution of canine hemotropic mycoplasma infections in Mediterranean countries and analysis of risk factors for infection. *Veterinary Microbiology*, 142, 276–284.

Núncio, M.S. & Alves, M.J. (2014): *Doenças associadas a artrópodes vetores e roedores*. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Lisboa: Guide-Artes Gráficas, Lda.

OIE (World Organisation for Animal Health) (2008): *Chapter 2.1.8: Leishmaniosis. Terrestrial Manual*. Acedido em Mai. 6, 2015, disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2008/pdf/2.01.08_LEISHMANIOSIS.pdf.

Oliva, G., Scalone, A., Manzillo, V.F., Gramiccia, M., Pagano, A., Di Muccio, T. & Gradino, L. (2006): Incidence and Time Course of *Leishmania infantum* Infections Examined by Parasitological, Serologic, and Nested-PCR Techniques in a Cohort of Naive Dogs Exposed to Three Consecutive Transmission Seasons. *Journal of Clinical Microbiology*, Apr., 1318–1322.

Oliveira, A.M., Diaz, S., Santos, C., Bourdeau, P. & Da Fonseca, I.P. (2010): Resultados de um inquérito realizado em 2007 sobre a distribuição geográfica, apresentação clínica, tratamento e prevenção da leishmaniose canina em Portugal. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, nº 109 ,573-576, 21-29.

Oliveira, T.M.F.S., Furuta, P.I., Carvalho, D. & Machado, R.Z. (2008): A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 17, 1, 7-11.

Otranto, D., Paradies, P., Lia, R.P., Latrofa, M.S., Testini, G., Cantacessi, C., Mencke, N., Galli, G., Capelli, G. & Stanneck, D. (2007): Efficacy of a combination of 10% imidacloprid/50% permethrin for the prevention of leishmaniasis in kennelled dogs in an endemic area. *Veterinary Parasitology*, 144, 270–278.

Otranto, D., Brianti, E., Latrofa, M.S., Annoscia, G., Weigl, S., Lia, R.P., Gaglio, G., Napoli, E., Giannetto, S., Papadopoulos, E., Miró, G., Dantas-Torres, F. & Bain, O. (2012): On a *Cercopithifilaria* sp. transmitted by *Rhipicephalus sanguineus*: a neglected, but widespread filarioid of dogs. *Parasites & Vectors*, 5:1.

Otranto, D., Brianti, E., Dantas-Torres, F., Weigl, S., Latrofa, M.S., Gaglio, G., Cauquil, L., Giannetto, S. & Bain, O. (2011): Morphological and molecular data on the dermal microfilariae of a species of *Cercopithifilaria* from a dog in Sicily. *Veterinary Parasitology*, 182, 221–229.

Otranto, D., Caprariis, D., Lia, R.P., Tarallo, V., Lorussi, V., Testini, G., Dantas-Torres, F., Latrofa, S., Diniz, P.P.V.P., Mencke, N., Maggi, R.G., Breitschwerdt, E., Capelli, G. & Stanneck, D. (2010a): Prevention of endemic canine vector-borne diseases using imidacloprid 10% and permethrin 50% in young dogs: A longitudinal field study. *Veterinary Parasitology*, 172, 323-332.

Otranto, D. & Dantas-Torres, F. (2010): Canine and feline vector-borne diseases in Italy: current situation and perspectives. *Parasites & Vectors*, 3:2.

Otranto, D. & Dantas-Torres, F. (2013): The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. *Trends in Parasitology*, July, Vol. 29, nº 7.

Otranto, D., Dantas-Torres, F. & Breitschwerdt, E. (2009): Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part one. *Trends in Parasitology*, Vol.25, Nº4.

Otranto, D., Dantas-Torres, F. & Breitschwerdt, E. (2009): Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part two. *Trends in Parasitology*, Vol.25, Nº5.

Otranto, D., Dantas-Torres, F., Brianti, E., Traversa, D., Petric, D., Genchi, C. & Capelli, G. (2013): Vector-borne helminths of dogs and humans in Europe. *Parasites & Vectors*, 6:16.

Otranto, D., Dantas-Torres, F., De Caprariis, D., Di Paola, G., Tarallo, V.D., Latrofa, M.S., Lia, R.P., Annoscia, G., Breitschwerdt, E.B., Cantacessi, C., Capelli, G. & Stanneck, D. (2013): Prevention of canine leishmaniasis in a hyper-endemic area using a combination of 10% imidacloprid/4.5% flumethrin. *PLOS ONE*. February, Vol. 8, nº2.

Otranto, D., Dantas-Torres, F., Weigl, S., Latrofa, M.S., Stanneck, D., Decaprarriis, D., Capelli, G. & Baneth, G. (2011): Diagnosis of *Hepatozoon canis* in young dogs by cytology and PCR. *Parasites & Vectors*, 4:55.

Otranto, D., Testini, G., Dantas-Torres, F., Latrofa, M.S., Diniz, P.P.V.P., Caprariis, D., Lia, R.P., Mencke, N., Stanneck, D., Capelli, G. & Breitschwerdt, E.B. (2010b): Diagnosis of Canine Vector-borne diseases in young dogs: a longitudinal study. *Journal of clinical microbiology*, Sept., 3316-3324.

Oyamada, M., Davoust, B., Boni, M., Dereure, J., Bucheton, B., Hammad, A., Itamoto, K., Okuda, M. & Inokuma, H. (2005): Detection of *Babesia canis rossi*, *B. Canis vogeli*, and *Hepatozoon canis* in dogs in a village of eastern Sudan by using a screening PCR and sequencing methodologies. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, Nov, p. 1343-1346.

Palatnik-De-Sousa, C.B. (2012): Vaccines for canine leishmaniasis. *Frontiers in immunology*. April, vol 3, article 69.

Paltrinieri, S., Solano-Gallego, L., Fondati, A., Lubas, G., Gradoni, L., Castagnaro, M., Crotti, A., Maroli, M., Oliva, G., Roura, X., Zatelli, A. & Zini, E. (2010): Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *JAVMA*, Vol. 236, nº 11, Jun 1.

Parola, P., Paddock, C.D. & Raoult, D. (2005): Tick-Borne Rickettsioses around the World: Emerging diseases challenging old concepts. *Clinical Microbiology Reviews*, p. 719–756.

Pennisi, M.G. (2015): Leishmaniosis of companion animals in Europe: An update. *Veterinary Parasitology*, 208, 35-47.

Pereira da Fonseca, I.M., Pereira, M.A., Villa de Brito, M.T., João, A., Pereira, N., Alexandre-Pires, G., Santos-Gomes, G. (2007). Canine Leishmaniosis: susceptibility of autochthonous and imported breeds in endemic areas. *Journées Scientifiques de l'Association pour l'Etude de l'Epidémiologie des Maladies Animales*, 30 May -1 June 2007, (pp. 35), Alfort - França.

Pereira da Fonseca, I.M. & Villa de Brito, M.T. (2008). Diagnóstico. In Santos-Gomes, G., & Pereira da Fonseca, I. *Leishmaniose Canina*. (pp. 83-92). Lisboa: Chaves Ferreira - Publicações.

Perez, M., Rikihisa, Y. & Wen, B. (1996): *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a Man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. *Journal of Microbiology*, Set, 2133-2139.

Pitorri, F., Dell'Orco, M., Carmichael, N., Barker, E.N., Hollywood, M. & Tasker, S. (2012): Use of real-time quantitative PCR to document successful treatment of *Mycoplasma haemocanis* infection with doxycycline in a dog. *Vet Clin Pathol*, 41/4, 493–496.

Poitout, F.M., Shinozaki, J.K., Stockwell, P.J., Holland, C.J. & Shukla, S.K. (2005): Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* infecting dogs in Western Washington State. *Journal of clinical microbiology*, Feb., Vol. 43, n°2, 796–801.

Portillo, A., Santibáñez, S., García-Álvarez, L., Palomar, A.M. & Oteo, J.A. (2015): Rickettsioses in Europe. *Microbes and Infection*, doi: 10.1016/j.micinf.2015.09.009.

Potter, T.M. & Macintire, D.K. (2010): *Hepatozoon americanum*: an emerging disease in the south-central/southeastern United States. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 20(1), 70-76.

Reis, L.E.S., Coura-Vital, W., Roatt, B.M., Bouillet, L.E.M., Ker, H.G., De Brito, R.C.F., Rsende, D.M., Carneiro, M., Giunchetti, R.C., Marques, M.J., Carneiro, C.M. & Reis, A.B. (2013): Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: A comparative study of three methods using skin and spleen from dogs with natural *Leishmania infantum* infection. *Veterinary Parasitology*, 197, 498-503.

René-Martellet, M., Lebert, I., Chêne, J., Massot, R., Leon, M., Leal, A., Badavelli, S., Chalvet-Monfray, K., Ducrot, C., Abrial, D., Chabanne, L. & Halos, L. (2015): Diagnosis and incidence risk of clinical canine monocytic ehrlichiosis under field conditions in Southern Europe. *Parasites & Vectors*, 8:3.

Rinaldi, L., Cringoli, G., Venco, L. & Genchi, C. (2013). Clinical monographs-Helminthosis. Dirofilariosis of dogs and cats. In F. Beugnet, *Guide to vector borne diseases of pets* (pp. 327-343).

Rishniw, M., Barr, S.C., Simpson, K.W., Frongillo, M.F., Franz, M. & Alpizar, J.L.D. (2006): Discrimination between six species of canine microfilariae by a single polymerase chain reaction. *Veterinary Parasitology*, 135, 303-314.

Rodrigues, F.C.T.S. (2014): *Babesiose canina no distrito de Bragança*. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária. Vila Real: Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

Rohdich, N., Roepke, R.K. & Zschiesche, E. (2014): A randomized, blinded, controlled and multi-centered field study comparing the efficacy and safety of Bravecto™ (fluralaner) against Frontline™ (fipronil) in flea- and tick-infested dogs. *Parasites and vectores*, 7:83.

Rodrigues, F.C.T.S. (2014). *Babesiose canina no distrito de Bragança*. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária. Vila Real: Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

Rojas, A., Rojas, D., Montenegro, V.M. & Baneth, G. (2015): Detection of *Dirofilaria immitis* and other arthropod-borne filarioids by an HRM real-time qPCR, blood-concentrating techniques and a serological assay in dogs from Costa Rica. *Parasites & Vectors*, 8:170.

Roupakias, S., Mitsakou, P. & Al Nimer, A. (2011): Tick removal. *J Prev Med Hyg*, 52, 40-44.

Roura, X. (2007): *Exposure to Arthropod-Borne Pathogens in Healthy or Leishmania infantum-Infected Dogs from Spain*. 2nd Canine Vector-Borne Disease (CVBD) Symposium – Sicily, Italy. Acedido em Out.15, 2015, disponível em: http://www.cvbd.org/fileadmin/media/cvbd/Proceedings_CVBD_2007_FINAL23042007.pdf.

Roura, X., Peters, I.R., Altet, L., Tabar, M.D., Barker, E.N., Planellas, M., Helps, C.R., Francino, O., Shaw, S.E. & Tasker, S. (2010): Prevalence of hemotropic mycoplasmas in healthy and unhealthy cats and dogs in Spain. *J Vet Diagn Invest*, 22, 270–274.

Roura, X., Fondati, A., Lubas, G., Gradoni, L., Maroli, M., Oliva, G., Paltrinieri, S., Zatelli, A. & Zini, E. (2013): Prognosis and monitoring of leishmaniasis in dogs: A working group report. *The Veterinary Journal*, 198, 43-47.

Rubini, A.S., Paduan, K.S., Lopes, V.V.A. & O'Dwyer, L.H. (2009): Molecular and parasitological survey of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) in dogs from rural área of Sao Paulo state, Brazil. *Parasitol Res*, 102, 895-899.

Rudoler, N., Baneth, G., Eyal, O., Straten, M. & Harrus, S. (2012): Evaluation of an attenuated strain of *Ehrlichia canis* as a vaccine for canine monocytic ehrlichiosis. *Vaccine*, 31, 226-233.

Rugg, D., Hair, J.A., Everett, R.E., Cunningham, J.R. & Carter, L. (2007): Confirmation of the efficacy of a novel formulation of metaflumizone plus amitraz for the treatment and control of fleas and ticks on dogs. *Veterinary Parasitology*, 150, 209-218.

Sabaté, D., Llinás, J., Homedes, J., Sust, M. & Ferrer, L. (2014): A single-centre, open-label, controlled, randomized clinical trial to assess the preventive efficacy of a domperidone-based treatment programme against clinical canine leishmaniasis in a high prevalence area. *Preventive Veterinary Medicine*, 115, 56-63.

Sainz, A., Tesouro, M.A., Rodriguez, F., Mayoral, I. & Mazzucchelli (1995): Seroprevalence of *Ehrlichia canis* infections in police dogs in Spain. *Preventative Veterinary Medicine*, 23, 179-182.

Sainz, A., Tesouro, M.A., Amusatogui, I., Rodriguez, F., Mazzucchelli, F. & Rodriguez, M. (2000): Prospective comparative study of 3 treatment protocols using doxycycline or imidocarb dipropionate in dogs with naturally occurring Ehrlichiosis. *J Vet Intern Med*, 14, 134–139.

Sainz, A., Roura, X., Miró, G., Estrada-Peña, A., Kohn, B., Harrus, S. & Solano-Gallego, L. (2015): Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. *Parasites & Vectors*, 8:75.

Santos, A.S., Alexandre, N., Sousa, R., Nuncio, M.S., Bacellar, F. & Dumler, J.S. (2009): Serological and molecular survey of *Anaplasma* species infection in dogs with suspected tickborne disease in Portugal. *Veterinary Record*, 164, 168-171.

Santos, J.P.G.A.B. (2014). *Estudo observacional transversal de parasitas em cães errantes no concelho de Vila Franca de Xira, Portugal*. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade de Lisboa.

Santos-Silva, M.M., Sousa, R., Santos, A.S., Melo, P., Encarnação, V. & Bacellar, F. (2006): Ticks parasitizing wild birds in Portugal: detection of *Rickettsia aeschlimanni*, *R. helvética* and *R. massiliae*. *Exp Appl Acarol*, 39, 331-338.

Santos-Silva, M.M., Beati, L., Santos, A.S., De Sousa, R., Nuncio, M.S., Melo, P., Santos-Reis, M., Fonseca, C., Formosinho, P., Vilela, C. & Bacellar, F. (2011): The hard-tick fauna of mainland Portugal (Acari: Ixodidae): an update on geographical distribution and known associations with hosts and pathogens. *Exp Appl Acarol*, 55, 85-121.

Santos-Silva, M.M., Santos, A.S., Carvalho, I.L., Sousa, R., Milhano, N., Osório, H., Alves, M.J. & Nuncio, M.S. (2014). Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infeciosas Doutor Francisco

Cambournac (Lisboa, Abril de 2014): Relatório REVIVE 2013 - Culicídeos e Ixodídeos. Rede de Vigilância de Vetores. Acedido em Set. 24, 2015, disponível em: http://repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/2233/1/Relatorio_REVIVE_2013.pdf.

Sasaki, M., Ohta, K., Matsuu, A., Hirata, H., Ikadai, H. & Oyamada, T. (2008): A molecular survey of *Mycoplasma haemocanis* in dogs and foxes in Aomori Prefecture, Japan. *J. Protozool. Res.*, 18, 57-60.

Sasanelli, M., Paradies, P., Greco, B., Eyal, O., Zaza, V. & Baneth, G. (2010): Failure of imidocarb dipropionate to eliminate *Hepatozoon canis* in naturally infected dogs based on parasitological and molecular evaluation methods. *Veterinary Parasitology*, 171, 194-199.

Schettters, T.P.M., Kleuskens, J.A.G.M., Scholtes, N.C., Gorenflot, A., Moubri, K. & Vermeulen, A.N. (2001): Vaccination of dogs against heterologous *Babesia canis* infection using antigens from culture supernatants. *Veterinary Parasitology*, 100, 75-86.

Schettters, T.P.M., Kleuskens, J.A.G.M., Scholtes, N.C., Van de Crommert, J., Krijnen, E., Moubri, K., Gorenflot, A. & Vermeulen, A.N. (2006): Onset and duration of immunity against *Babesia canis* infection in dogs vaccinated with antigens from culture supernatants. *Veterinary Parasitology*, 138, 140-146.

Schnittger, L., Rodriguez, A.E., Florin-Christensen, M. & Morrison, D.A. (2012): *Babesia*: A world emerging. *Infection, Genetics and Evolution*, 12, 1788-1809.

Schuele, G., Barnett, S., Bapst, B., Cavaliero, T., Luempert, L., Strehlau, G., Young, D.R., Moran, C. & Junquera, P. (2008): The effect of water and shampooing on the efficacy of a pyriprole 12.5% topical solution against brown dog tick (*Rhipicephalus sanguineus*) and cat flea (*Ctenocephalides felis*) infestations on dogs. *Veterinary Parasitology* 151, 300-311.

Seixas, R., Alho, A.M., Guerra, D. & de Carvalho, L.M. (2011): Doenças caninas de transmissão vectorial: uma picada com muitas consequências! *Veterinary Medicine*, 77: 23-46.

Shaw, S. & Day, M. (2005). Introduction. In S.E. Shaw & M.J. Day (Eds), *Arthropod-borne infectious diseases of the dog and cat*. (pp. 9-10). London: Manson Publishing.

Sherding, R.G. (2006). Rickettsiosis, Ehrlichiosis, Anaplasmosis, and Neorickettsiosis. In *Saunders Manual of Small Animal Practice*. (3rd ed.). (pp. 178-183). Missouri: ELSEVIER.

Shipov, A., Klement, E., Reuveni-Tager, L., Waner, T. & Harrus, S. (2008): Prognostic indicators for canine monocytic ehrlichiosis. *Veterinary Parasitology*, 153, 131-138.

Shoop, W.L., Hartline, E.J., Gould, B.R., Waddell, M.E., McDowell, R.G., Kinney, J.B., Lahm, G.P., Long, J.K., Xu, M., Wagerle, T., Jones, G.S., Dietrich, R.F., Mark, D.C., Schroeder, E., Rhoades, D.F., Benner, E.A., & Confalone, P.N. (2014): Discovery and mode of action of afoxolaner, a new isoxazoline parasiticide for dogs. *Veterinary Parasitology*, 201, 179-189.

Silva, F.L., Oliveira, R.G., Silva, T.M.A., Xavier, M.N., Nascimento, E.F. & Santos, R.L. (2009): Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 160, 55-59.

Silva, M.M., Santos, A.S., Formosinho, P. & Bacellar, F. (2006): Carraças associadas a patologias infecciosas em Portugal. *Acta Met Port*, 19, 39-48.

Silva, I.P.C. (2011). *Estudo de hemoparasitas transmitidos por vetores, em cães de canil, Setúbal, Portugal*. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade de Lisboa.

Simões, P.B., Cardoso, L., Araújo, M., Yisaschar-Mekuzas, Y. & Baneth, G. (2011): Babesiosis due to the canine *Babesia microti*-like small piroplasm in dogs - first report from Portugal and possible vertical transmission. *Parasites & Vectors*, 4:50.

Simón, F., López-Belmonte, J., Marcos-Atxutegi, C., Morchón, R. & Martín-Pacho, J.R. (2005): What is happening outside North America regarding human dirofilariasis? *Veterinary Parasitology*, 133, 181-189.

Slimane, T.B., Chouihi, E., Ahmed, S.B.H., Chelbi, I., Barhoumi, W., Cherni, S., Zoghalmi, Z., Gharbi, M. & Zhioua, E. (2014): An investigation on vertical transmission of *Leishmania infantum* in experimentally infected dogs and assessment of offspring's infectiousness potential by xenodiagnoses. *Veterinary Parasitology*, 206, 282-286.

Soares, M.R.A., De Mendonça, I.L., Do Bonfim, J.M., Rodrigues, J.A., Werneck, G.L. & Costa, C.H.N. (2011): Canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil: Relationship between clinical features and infectivity for sand flies. *Acta Tropica*, 117, 6-9.

Solano-Gallego, L., Ramos, G., Riera, C., Arboix, M., Alberola, J. & Ferrer, L. (2000): The Ibiza hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Veterinary Parasitology* 90, 37-45.

Solano-Gallego, L., Riera, C., Roura, X., Iniesta, L., Gallego, M., Valladares, J.E., Fisa, R., Castillejo, S., Alberola, J., Ferrer, L., Arboix, M. & Portús, M. (2001): *Leishmania infantum* specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. *Veterinary Parasitology* 96, 265-276.

Solano-Gallego, L., Kidd, L., Trotta, M., Di Marco, M., Caldin, C., Furlanello, T. & Breitschwerdt, E. (2006): Febrile illness associated with *Rickettsia conorii* infection in dogs from Sicily. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 12, Nº 12.

Solano-Gallego, L., Trotta, M., Carli, E., Carey, B., Caldin, M. & Furlanello, T. (2008): *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* clinicopathological findings and DNA detection by means of PCR-RFLP in blood from Italian dogs suspected of tick-borne disease. *Veterinary Parasitology*, 157, 211-221.

Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G. & Baneth, G. (2009): Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 165, 1-18.

Solano-Gallego, L. & Baneth, G. (2011): Babesiosis in dogs and cats. Expanding parasitological and clinical spectra. *Veterinary Parasitology*, 181, 48-60.

Solano-Gallego, L., Miró, G., Alek Koutinas, Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G. & Baneth, G. (2011): LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors*, 4:86.

Solano-Gallego, L., Caprì, A., Pennisi, M.G., Caldin, M., Furlanello, T. & Trotta, M. (2015): Acute febrile illness is associated with *Rickettsia* spp infection in dogs. *Parasites & Vectors*, 8:216.

Sousa, R., Nóbrega, S.D., Bacellar, F. & Torgal, J. (2003): Sobre a realidade da Febre Escaro-Nodular em Portugal. *Acta Médica Portuguesa*, 16, 429-436.

Sousa, S., Lopes, A.P., Cardoso, L., Silvestre, R., Schalling, H., Reed, S.G. & Da Silva, A.C. (2011): Seroepidemiological survey of *Leishmania infantum* infection in dogs from northeastern Portugal. *Acta Tropica* 120, 82-87.

Sousa, R., Pereira, B.I., Nazareth, C., Cabral, S., Ventura, C., Crespo, P., Marques, N. & Saraiva da Cunha (2013): *Rickettsia slovaca* infection in humans, Portugal. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 19, No. 10, Outubro.

Stanneck, D., Ebbinghaus-Kintscher, U., Schoenhense, E., Kruedewagen, E.M., Turberg, A., Leisewitz, A., Jiritschka, W. & Krieger, K. (2012a): The synergistic action of imidacloprid and flumethrin and their release kinetics from collars applied for ectoparasite control in dogs and cats. *Parasites & Vectors*, 5:73.

Stanneck, D., Rass, J., Radeloff, I., Kruedewagen, E., Le Sueur, C., Hellmann, K. & Krieger, K. (2012b): Evaluation of the long-term efficacy and safety of an imidacloprid 10%/flumethrin 4.5% polymer matrix collar (Seresto®) in dogs and cats naturally infested with fleas and/or ticks in multicentre clinical field studies in Europe. *Parasites & Vectors*, 5:66.

Suzuki, K., Waakabayashi, H., Takahashi, M., Fukushima, K., Yabuki, A. & Endo, Y. (2007): A possible treatment strategy and clinical factors to estimate the treatment response in *Babesia gibsoni* infection. *J. Vet. Med. Sci.*, 69 (5), 563-568.

Sykes, J.E., Bailiff, N.L., Ball, L.M., Foreman, O., Georger, J.W. & Fry, M.M. (2004): Identification of a novel hemotropic Mycoplasma in a splenectomized dog with hemic neoplasia. *JAVMA*, Vol 224, No. 12, June 15.

Sykes, J.E., Ball, L.M., Bailiff, N.L. & Fry, M.M. (2005): *Candidatus* Mycoplasma haematoparvum, a novel small haemotropic Mycoplasma from a dog. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 27-30.

Taylor, M.J. & Hoerauf, A. (1999): *Wolbachia* Bacteria of Filarial Nematodes. *Parasitology Today*, Vol. 15, nº 11.

Taylor, M.A, Coop, R.L. & Will, R.L. (2007). *Veterinary Parasitology*, (3rd ed). Oxford, UK: Blackwell publishing.

Tomás, A.M. & Romão, S.F. (2008). Biologia do parasita. In Santos-Gomes, G., & Pereira da Fonseca, I. *Leishmaniose Canina*. (pp. 7-26). Lisboa: Chaves Ferreira - Publicações.

Tommasi, A.S., Otranto, D., Dantas-Torres, F., Capelli, G., Breitschwerdt, E.B. & Caprariis, D. (2013): Are vector-borne pathogen co-infections complicating the clinical presentation in dogs? *Parasites & Vectors*, 6:97.

Trapp, S.M., Dagnone, A.S., Vidotto, O., Freire, R.L., Amude, A.M. & Morais, H.S.A. (2006): Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. *Veterinary Parasitology*, 140, 223-230.

Traversa, D., Cesare, A. & Conboy, G. (2010): Canine and feline cardiopulmonary parasitic nematodes in Europe: emerging and underestimated. *Parasites & Vectors*, 3:62.

Unver, A., Perez, M., Orellana, N., Huang, H. & Rikihisa, Y. (2001): Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks, and a Human in Venezuela. *Journal of clinical microbiology*, Ag, 2788-2793.

Valle, F.S., Messick, J.B., Dos Santos, A.P., Kreutz, L.C., Duda, N.C.B., Machado, G., Corbellini, L.G., Biondo, A.W. & González, F.H.D. (2014): Identification, occurrence and clinical findings of canine hemoplasmas in southern Brazil. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 37, 259-265.

Venco, L. (2007). Heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease in dogs. In Genchi C, Rinaldi L, Cringoli G. (eds). *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat and human infections. Zagreb, Croatia; 139-144. Acedido em Set. 27, 2015, disponível em <http://www.ivos.org/proceedings/dirofilaria/2007/venco1.pdf>.

Vial, H.J & Gorenflot, A. (2006): Chemotherapy against babesiosis. *Veterinary Parasitology*, 138, 147-160.

Vidal, R.A.C. (2013). Rastreio de agentes de doenças caninas de transmissão vectorial numa população de cães com funções militares e policiais. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade de Lisboa.

Vieira, L., Silvestre-Ferreira, A.C., Fontes-Sousa, A.P., Balreira, A.C., Morchón, R., Carretón, E., Villhena, H., Simón, F., & Montoya-Alonso, J.A. (2014): Seroprevalence of heartworm (*Dirofilaria immitis*) in feline and canine hosts from central and northern Portugal. *Journal of Helminthology*, nº89, 625-629.

Virbac Portugal (2012). *Resumo de características do medicamento: CANILEISH*. Acedido em Set. 25, 2015, disponível em: [http://www.virbac.pt/p-virbacptpubpt/display.aspx?srv=p-virbacpt&typ=pub&lang=pt&cmd=view&style=styles/specie.xsl&select=PRODUCT\[@ID\\$eq\\$PRODUCT_140\]|SECTION\[@ID\\$eq\\$SECTION_211\]&affp=&](http://www.virbac.pt/p-virbacptpubpt/display.aspx?srv=p-virbacpt&typ=pub&lang=pt&cmd=view&style=styles/specie.xsl&select=PRODUCT[@IDeqPRODUCT_140]|SECTION[@IDeqSECTION_211]&affp=&).

Virbac (2012). Speed Leish K. Acedido em Set. 29, 2015, disponível em: <http://www.my-virbac.co.uk/file.aspx?id=10>.

Walther, F.M., Fisara, P., Allan, M.J., Roepkel, R.K.A. & Nuernberger, M.C. (2014): Safety of the concurrent treatment of dogs with Bravecto™ (fluralaner) and Scalibor™ protectorband (deltamethrin). *Parasites & Vectors*, 7:105.

Watier-Grillot, S., Marié, J.L., Cabre, O. & Davoust, B. (2011): Survey of Canine *Dirofilaria immitis* infection in New Caledonia. *Veterinary Medicine International*, Vol. 2011, article ID 380680.

Wen, B., Rikihisa, Y., Mott, J.M., Greene, R., Kim, H.H., Zhi, N., Couto, G.C., Unver, A. & Bartsch, R. (1997): Comparison of Nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. *Journal of Clinical Microbiology*, July, 1852-1855.

Wengi, N., Willi, B., Boretti, F.S., Cattori, V., Riond, B., Meli, M.L., Reusch, C.E., Lutz, H. & Hofmann-Lehmann, R. (2008): Real-time PCR-based prevalence study, infection follow-up and molecular characterization of canine hemotropic mycoplasmas. *Veterinary Microbiology*, 126, 132-141.

Zahler, M., Schein, E., Rinder, H. & Gothe, R. (1998): Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs. *Parasitol Res*, 84, 544-548.

Zemtsova, G., Killmaster, L.F., Mumcuoglu, K.Y. & Levin, M.L. (2010): Co-feeding as a route for transmission of *Rickettsia conorii israelensis* between *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Exp Appl Acarol*, 52:383-392.

ANEXOS

1. MegaScreen FLUORICKETTSIA conorii

Kit para a Detecção de Anticorpos anti-Rickettsia conorii em Soro ou Plasma

Procedimento

Retirar os componentes do *kit* e deixá-los à temperatura ambiente (20-25°C) antes de abrir os frascos ou os invólucros das lâminas. O conjugado tem sempre de ser armazenado no escuro.

1. Remover cuidadosamente a lâmina do invólucro e identificá-la com o nome ou número dos pacientes.
2. Preparar diluições iniciais de 1:64 (5 µL de amostra + 315 µL de PBS) para todos os soros não testados. Nos soros positivos, preparar diluições seriadas (50 µL da diluição anterior + 50 µL de PBS), para determinar o título máximo.
3. Os controlos Positivo e Negativo estão prontos a usar. Para cada lâmina, adicionar 20 µL do controlo Negativo e 20 µL do controlo Positivo.
4. Aplicar 10 µL de cada diluição no poço associado e identificar a sua localização para referência posterior. A aplicação das amostras deve ser feita na periferia dos poços.
5. Colocar a lâmina numa câmara húmida e incubar durante 30 minutos a 37°C.
6. Remover a câmara húmida da incubadora. Lavar os poços com PBS (se for utilizada uma garrafa de lavagem, aplicar uma corrente suave no centro da lâmina e não diretamente nos poços). Eliminar as gotas remanescentes sacudindo a lâmina e repetir a lavagem em PBS mais duas vezes, cinco minutos cada. Não permitir que os poços sequem entre os passos de lavagem. Retirar as lâminas e, apoiando a aresta maior da lâmina sobre papel de filtro, bater com precaução.
7. Adicionar imediatamente 1 gota de Conjugado anti-Cão-IgG-FITC em cada poço. A aplicação de soro ou conjugado deve ser feita a partir da periferia dos poços. Colocar as lâminas na câmara húmida a incubar por mais 30 minutos a 37°C. A incubação deve ser feita no escuro para proteger o conjugado fotossensível.
8. Lavar as lâminas como no passo 6.
9. Adicionar 2 gotas de meio de montagem na lamela e colocar a lâmina cuidadosamente sobre a lamela, comprimindo-a de modo a remover as bolhas de ar aprisionadas.
10. Observar as lâminas coradas numa ampliação de 400x, comparando cada poço com a intensidade visual e aparência do padrão de fluorescência visualizado nos poços de controlo Positivo e Negativo.
11. As lâminas podem ser armazenadas no escuro, entre 2-8°C, até 24 horas.

2. MegaScreen FLUOANAPLASMA phagocytophilum

Kit para a Detecção de Anticorpos anti-Anaplasma phagocytophilum em Soro ou Plasma

Procedimento

Retirar os componentes do *kit* e deixá-los à temperatura ambiente (20-25°C) antes de abrir os frascos ou os invólucros das lâminas. O conjugado tem sempre de ser armazenado no escuro.

1. Remover cuidadosamente a lâmina do invólucro e identificá-la com o nome ou número dos pacientes.
2. Preparar diluições iniciais de 1:50 (5 µL de amostra + 245 µL de PBS) para todos os soros não testados. Nos soros positivos, preparar diluições seriadas (50 µL da diluição anterior + 50 µL de PBS), para determinar o título máximo.
3. Os controlos Positivo e Negativo estão prontos a usar. Para cada lâmina, adicionar 20 µL do controlo Negativo e 20 µL do controlo Positivo.
4. Aplicar 20 µL de cada diluição no poço associado e identificar a sua localização para referência posterior. A aplicação das amostras deve ser feita a partir da periferia dos poços.
5. Colocar a lâmina numa câmara húmida e incubar durante 30 minutos a 37°C.
6. Remover a câmara húmida da incubadora. Lavar os poços com PBS (se for utilizada uma garrafa de lavagem, aplicar uma corrente suave no centro da lâmina e não diretamente nos poços). Eliminar as gotas remanescentes sacudindo a lâmina e repetir a lavagem em PBS mais duas vezes, cinco minutos cada. Não permitir que os poços sequem entre os passos de lavagem. Retirar as lâminas e, apoiando a aresta maior da lâmina sobre papel de filtro, bater com precaução.
7. Adicionar imediatamente 1 gota de Conjugado anti-Cão-IgG-FITC em cada poço. A aplicação de soro ou conjugado deve ser feita a partir da periferia dos poços. Colocar as lâminas na câmara húmida a incubar por mais 30 minutos a 37°C. A incubação deve ser feita no escuro para proteger o conjugado fotossensível.
8. Lavar as lâminas como no passo 6.
9. Adicionar 2 gotas de meio de montagem na lamela e colocar a lâmina cuidadosamente sobre a lamela, comprimindo-a de modo a remover as bolhas de ar aprisionadas.
10. Observar as lâminas coradas numa ampliação de 400x, comparando cada poço com a intensidade visual e aparência do padrão de fluorescência visualizado nos poços de controlo Positivo e Negativo.
11. As lâminas podem ser armazenadas no escuro, entre 2-8°C, até 24 horas.

3. MegaScreen FLUOEHRlichia canis

Kit para a Detecção de Anticorpos anti-*Ehrlichia canis* em Soro ou Plasma

Procedimento

Retirar os componentes do *kit* e deixá-los à temperatura ambiente (20-25°C) antes de abrir os frascos ou os invólucros das lâminas. O conjugado tem sempre de ser armazenado no escuro.

1. Remover cuidadosamente a lâmina do invólucro e identificá-la com o nome ou número dos pacientes.
2. Preparar diluições iniciais de 1:40 (5 µL de amostra + 195 µL de PBS) para todos os soros não testados.
3. Os controlos Positivo e Negativo estão prontos a usar.
4. Aplicar 10 µL de cada diluição no poço associado e identificar a sua localização para referência posterior. A aplicação das amostras deve ser feita a partir da periferia dos poços.
5. Colocar a lâmina numa câmara húmida e incubar durante 30 minutos a 37°C.
6. Remover a câmara húmida da incubadora. Lavar os poços com PBS (se for utilizada uma garrafa de lavagem, aplicar uma corrente suave no centro da lâmina e não diretamente nos poços). Eliminar as gotas remanescentes sacudindo a lâmina e repetir a lavagem em PBS mais duas vezes, cinco minutos cada. Não permitir que os poços sequem entre os passos de lavagem. Retirar as lâminas e, apoiando a aresta maior da lâmina sobre papel de filtro, bater com precaução.
7. Adicionar imediatamente 1 gota de Conjugado anti-Cão-IgG-FITC em cada poço. A aplicação de soro ou conjugado deve ser feita a partir da periferia dos poços. Colocar as lâminas na câmara húmida a incubar por mais 30 minutos a 37°C. A incubação deve ser feita no escuro para proteger o conjugado fotossensível.
8. Lavar as lâminas como no passo 6.
9. Adicionar 2 gotas de meio de montagem na lamela e colocar a lâmina cuidadosamente sobre a lamela, comprimindo-a de modo a remover as bolhas de ar aprisionadas.
10. Observar as lâminas coradas numa ampliação de 400x, comparando cada poço com a intensidade visual e aparência do padrão de fluorescência visualizado nos poços de controlo Positivo e Negativo.
11. As lâminas podem ser armazenadas no escuro, entre 2-8°C, até 24 horas.

4. Leishmania-Spot IF REF 75 931

Kit para a detecção de Anticorpos anti-*Leishmania infantum* em Soro ou Plasma

Procedimento

1. Tirar da embalagem o número de lâminas necessário (uma lâmina por soro). Deixar as lâminas à temperatura ambiente do laboratório durante aproximadamente 15 minutos antes de abrir as saquetas.
2. Diluir os soros a analisar a 1/40 em PBS, e efetuar diluições sucessivas de 2 em 2 em PBS.
3. Colocar em cada círculo 10 µl de cada diluição de soro (uma diluição por círculo). Prever um controlo conjugado (10 µl de PBS) por série de soros.
4. Incubar durante 30 min a 37 °C em câmara húmida.
5. Preparar o PBS-Tween: a 1 litro de PBS, acrescentar 65 µl +5 µl de Tween 80.
6. Lavar as lâminas em PBS-Tween 2 vezes durante 5 minutos. Passar rapidamente por um banho de água destilada. Escorrer. Secar.
7. Preparar o conjugado: Diluir em PBS a Fluoline H na diluição previamente determinada (consultar o folheto informativo da Fluoline H, ref. 75 603). Acrescentar o Evans Blue (ref. 75 491) (50 µl de Evans Blue em 5 ml da fluolina diluída).
8. Cobrir cada círculo (inclusive o controlo) com 10 µl de conjugado.
9. Incubar durante 30 min a 37 °C em câmara húmida.
10. Lavar as lâminas em PBS-Tween 2 vezes durante 5 minutos. Passar rapidamente por um banho de água destilada. Secar.
11. Colocar 2 gotas de Fluoprep (ref. 75 521) em cada lâmina. Cobrir com uma lamela de 50x24 mm.
12. Efetuar de imediato a leitura em microscópio de fluorescência, no comprimento de onda de 425 nm. A observação foi feita utilizando ocular 10x e objetiva 40x, numa ampliação total de 400x.

ANEXO II

Pesquisa de anticorpos por ELISA através do teste BABESIA-ELISA DOG (afosa®) Ref. FLI-B 572

Protocolo da execução do teste ELISA para a detecção de anticorpos anti-*Babesia* spp.

1. Os reagentes devem ser colocados à temperatura ambiente (18 a 25°C) antes da utilização.
2. Realizar a diluição das amostras: 5 µl de soro a testar e 495 µl de diluente (1:100).
3. Adicionar 100µl dos controlos positivo e negativo nos pocilhos definidos pelo operador.
4. Adicionar 100µl de cada amostra diluída nos pocilhos (um pocilho por amostra).
5. Cobrir a placa que contém os pocilhos e incubar à temperatura ambiente durante 60 minutos.
6. Despejar ou aspirar o conteúdo dos pocilhos. Executar lavagem dos pocilhos com 300ul de solução de lavagem, despejando de cada vez o conteúdo dos pocilhos e executar esta operação três vezes (realizar quatro lavagens no total).
7. Adicionar 100µl de conjugado (IgG anti-cão marcado com peroxidase) em cada pocilho.
8. Cobrir a placa que contém os pocilhos e incubar à temperatura ambiente durante 60 minutos.
9. Despejar ou aspirar o conteúdo dos pocilhos. Executar lavagem dos pocilhos com 300ul de solução de lavagem, despejando de cada vez o conteúdo dos pocilhos e executar esta operação três vezes (realizar quatro lavagens no total).
10. Adicionar 100µl de substrato (TMB = 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) em cada pocilho.
11. Cobrir a placa que contém os pocilhos e incubar à temperatura ambiente durante exactamente 15 minutos.
12. Após os 15 minutos não despejar o conteúdo. Adicionar 100µl de solução de paragem a cada pocilho. Agitar suavemente a placa com os pocilhos para homogeneizar a solução de paragem.
13. Proceder à leitura das densidade ótica dos pocilhos com o espectrofotómetro nos 450nm de comprimento de onda, dentro de dez minutos após a adição da solução de paragem. Após a validação dos valores obtidos, através de cálculos disponibilizados pelo protocolo original, procede-se ao cálculo dos resultados.

A interpretação dos resultados das densidades ópticas obtidas é a seguinte:

- Valor inferior a 14 é negativo.
- Valor entre 14 e 19 é duvidoso (repetir teste em 4 a 6 semanas).
- Valor superior a 19 é positivo.

ANEXO III

Folha de registo para recolha de informação durante as colheitas

Identificação do cão

Nome animal: _____ Amostra: ____

Idade: ____ Sexo: M F Raça: _____

Pelagem (sublinhar a pretendida): curta, cerdosa, comprida.

Tipo de alimentação (sublinhar a pretendida): seco (ração), húmido, caseira.

Alojamento (riscar o que não interessa):

Canil / ar livre / dentro de casa / dentro e fora de casa

Meio envolvente (sublinhar a pretendida): urbano / suburbano/ rural

Presença de ectoparasitas: Sim / Não. Quais? _____

Desparasitação: interna / externa. Frequência: _____

Profilaxia e/ou tratamento: sim__ não__

Se sim, com que produtos: coleira impregnada, banhos, pó *spot on*, *spray*.

Outros: _____

Vacinação (sublinhar a pretendida): antirrábica / polivalentes /Outras: _____

Cuidados após treino/caça: _____

Observações: _____

ANEXO IV

Quadro geral com informação relativa às informações recolhidas nos dias da colheita e os resultados obtidos através de diferentes técnicas de diagnóstico.

Nº Amostra	Raça	Sexo	Pelagem	Idade	Meio envolvente	Tipo prevenção Pulverização (c/ fipronil) Banho (c/ amitraz)	Resultados obtidos após realização das técnicas de diagnóstico									Nº agentes de DCTV
							Microfilárias	<i>Dirofilaria immitis</i>	<i>Hepatozoon canis</i>	Mycoplasma spp.	<i>Anaplasma</i> spp.	Babesia spp.	Ehrlichia canis	Rickettsia conorii	Leishmania infantum	
1	Drahthaar	F	Cerdosa	4	Urbano	Pulverização	P	N	N	N	N	N	N	N	N	1
2	Beagle	F	Curta	4	Urbano	Pulverização	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0
3	Podengo	F	Curta	10	Urbano	Pulverização	P	N	N	N	N	N	N	P	N	2
4	Podengo	F	Curta	5	Urbano	Pulverização	N	N	N	N	N	D	N	N	N	0
5	Podengo	F	Curta	6	Urbano	Pulverização	N	N	N	P	N	N	P	P	N	3
6	Podengo	M	Curta	7	Urbano	Pulverização	N	N	N	N	N	N	P	P	N	2
7	Drahthaar	F	Cerdosa	5	Suburbano	Pulverização	N	N	N	N	N	N	N	P	N	1
8	Braco	F	Curta	2	Suburbano	Pulverização	N	N	N	N	N	P	P	P	N	3
9	Podengo	F	Cerdosa	8	Suburbano	Pulverização	N	N	N	N	N	D	N	P	N	1
10	Podengo	F	Cerdosa	5	Suburbano	Pulverização	N	N	N	N	N	N	N	P	N	1
11	Podengo	F	Curta	8	Suburbano	Pulverização	N	N	N	N	N	N	P	P	N	2
12	Beagle	F	Cerdosa	6	Suburbano	Pulverização	P	P	N	N	N	N	N	P	N	3
13	Podengo	F	Curta	5	Suburbano	Pulverização	N	N	N	N	N	N	P	P	N	2
14	X Podengo	F	Curta	4	Suburbano	Banho	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0
15	X Podengo	F	Cerdosa	6	Suburbano	Banho	P	N	N	N	N	N	N	N	N	1
16	X Podengo	F	Curta	5	Suburbano	Banho	N	N	N	N	P	N	P	P	N	3
17	X Podengo	M	Curta	5	Suburbano	Banho	N	N	N	N	N	N	P	P	N	2
18	X Podengo	M	Cerdosa	3	Suburbano	Banho	N	N	N	N	N	N	P	P	N	2
19	X Podengo	F	Curta	4	Suburbano	Banho	N	N	N	N	N	N	P	N	N	1
20	X Podengo	F	Curta	5	Suburbano	Banho	N	N	N	N	P	P	P	P	N	4
21	X Podengo	M	Curta	5	Suburbano	Banho	P	N	N	N	P	P	P	P	N	5
22	X Podengo	F	Cerdosa	6	Suburbano	Banho	N	N	N	N	N	P	N	P	N	2
23	X Podengo	F	Curta	5	Suburbano	Banho	N	N	N	N	N	P	N	P	P	3
24	X Podengo	F	Curta	3	Suburbano	Banho	N	N	N	N	P	N	N	P	N	2

25	X Podengo	M	Cerdosa	2	Suburbano	Banho	N	N	N	P	N	N	P	P	N	3
26	X Podengo	F	Curta	4	Suburbano	Banho	N	N	N	N	N	N	N	P	N	1
27	X Podengo	F	Curta	4	Suburbano	Banho	N	N	N	N	N	N	N	P	N	1
28	Podengo	F	Curta	5	Urbano	Pulverização	N	N	N	N	N	N	P	P	N	2
29	Podengo	F	Curta	8	Urbano	Pulverização	N	N	N	N	N	N	N	P	N	1
30	Podengo	F	Curta	4	Urbano	Pulverização	N	N	N	P	N	N	N	P	N	2
31	Podengo	M	Cerdosa	2	Urbano	Pulverização	N	N	N	N	P	N	P	P	N	3
32	Podengo	F	Curta	4	Urbano	Pulverização	N	N	N	P	N	N	N	P	N	2
33	Podengo	F	Curta	4	Urbano	Pulverização	P	N	N	N	N	N	N	P	N	2
34	Podengo	F	Curta	14	Urbano	Pulverização	P	N	N	N	N	P	N	P	N	3
35	Podengo	F	Cerdosa	2	Urbano	Pulverização	N	N	N	N	N	N	N	P	N	1
36	Podengo	F	Cerdosa	2	Urbano	Pulverização	P	N	N	N	N	N	N	P	N	2
37	Podengo	F	Curta	1	Urbano	Pulverização	N	N	N	N	P	P	P	P	N	4
38	X Podengo	F	Curta	6	Urbano	Banho	N	N	P	N	N	N	N	P	N	2
39	Podengo	F	Curta	4	Suburbano	Banho	N	N	N	P	N	N	P	P	N	3
40	Podengo	F	Cerdosa	3	Suburbano	Banho	P	N	N	N	N	N	N	P	N	2
41	X Teckel	F	Curta	5	Suburbano	Banho	N	N	N	N	N	N	N	P	N	1
42	X Podengo	M	Curta	3	Suburbano	Banho	N	N	N	P	N	N	N	P	N	2
43	Podengo	F	Curta	5	Suburbano	Banho	N	N	N	P	N	N	N	P	N	2
44	Podengo	F	Cerdosa	3	Suburbano	Banho	N	N	N	N	N	N	N	P	N	1
45	X Beagle	F	Curta	4	Suburbano	Banho	P	N	N	N	N	N	N	P	N	2
46	X Podengo	M	Cerdosa	3	Suburbano	Banho	P	N	N	N	N	N	N	P	N	2
47	Podengo	F	Curta	5	Suburbano	Banho	N	N	N	N	N	N	P	P	N	2
48	Podengo	M	Cerdosa	4	Suburbano	Banho	N	N	N	N	N	N	N	P	N	1
49	Labrador	F	Curta	2	Suburbano	Banho	N	N	N	N	N	N	N	P	N	1
50	X Beagle	F	Curta	5	Suburbano	Pulverização	N	N	N	N	P	P	P	P	N	4
51	Podengo	F	Curta	2	Suburbano	Pulverização	N	N	N	N	P	P	P	P	N	4
52	Podengo	F	Cerdosa	2	Suburbano	Pulverização	N	N	N	N	N	N	N	P	N	1
53	Podengo	M	Curta	7	Suburbano	Pulverização	N	N	N	N	N	P	P	P	N	3
54	X Beagle	M	Curta	5	Suburbano	Pulverização	N	N	N	N	N	P	N	P	N	2
55	Pointer	F	Curta	10	Suburbano	Pulverização	P	N	N	N	P	N	N	P	N	3
56	Podengo	F	Curta	3	Suburbano	Pulverização	N	N	N	P	P	P	P	P	N	5

57	Setter inglês	F	Comprida	3	Suburbano	Pulverização	N	N	N	N	N	N	N	P	N	1
58	X Beagle	F	Curta	6	Suburbano	Pulverização	N	N	P	P	N	P	P	P	P	6
59	Podengo	F	Curta	3	Suburbano	Pulverização	N	N	N	N	P	P	P	P	N	4
60	X Podengo	F	Curta	4	Suburbano	Pulverização	N	N	N	P	P	N	P	P	N	4

Legendas

F: fêmea.

M: macho.

D: resultado duvidoso.

N: resultado negativo.

P: resultado positivo.